

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Evaluación del Efecto de Dos Microorganismos en la Colonización de la Raíz y Promoción del Crecimiento y Desarrollo de Plántulas de Maíz (*Zea mays* L.)

Por:

**MARIANA PÉREZ GARCÍA**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA**

Saltillo, Coahuila, México

Mayo del 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Evaluación del Efecto de Dos Microorganismos en la Colonización de la Raíz y Promoción del Crecimiento y Desarrollo de Plántulas de Maíz (*Zea mays* L.)

Por:

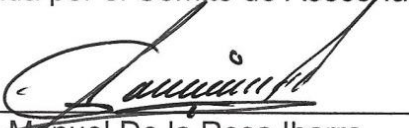
**MARIANA PÉREZ GARCÍA**


TESIS


Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA**

Aprobada por el Comité de Asesoría:

  
Dr. Manuel De la Rosa Ibarra  
Asesor Principal

  
Dr. Antonio Juárez Maldonado  
Coasesor

  
Dra. Silvia Yudith Martínez Amador  
Coasesor

  
Dr. Gabriel Gallegos Morales  
Coordinador de la División de Agronomía

Coordinación  
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Mayo del 2017

## DEDICATORIA

A mis padres el Sr. Jaime Pérez Roque y la Sra. Leticia García Olivares, por ser el mejor ejemplo de amor, honestidad, responsabilidad y confianza que he tenido en la vida; por su paciencia, dedicación, apoyo y por la constante motivación que me dan para cumplir mis sueños.

A mis hermanos Jaime Pérez García y Abraham Pérez García, por el apoyo que me otorgan, la alegría que le inyectan a cada uno de mis días y por alentarme a seguir adelante siempre.

A mis abuelos Refugio, Catalina y Tranquilino por ser un ejemplo de lucha constante y enseñarme que a pesar de las adversidades se puede continuar adelante.

A mis tíos y tías, en especial a Estela, Sergio, Rosario, Rubén, Rosalba, Luz, Patricia y Lupita, quienes me han ofrecido un segundo hogar, me han apoyado, guiado y confiado en mí.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida y salud para culminar esta meta en mi vida.

A mi Alma Mater la Universidad Autónoma Antonio Narro, por abrirme las puertas al conocimiento, la cultura y la amistad y ser uno de los cimientos para cumplir esta meta.

A mis Asesores el Dr. Manuel De la Rosa por sus enseñanzas y por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto; al Dr. Antonio Juárez Maldonado, la Dra. Silvia Yudith Martínez por formar parte de este proyecto. Al Dr. Edmundo Rodríguez por su colaboración y a la Ing. María Santiago por su gran apoyo en la realización del proyecto.

A mis Profesores por brindarme sus conocimientos, consejos y permitirme desarrollar el sentido de la curiosidad.

A mi familia por estar conmigo cada día y apoyarme en todo sentido.

A Axel Francisco de la Cruz por brindarme su apoyo, amor, consejos, confianza y por haberse convertido en una de mis alegrías.

A mis amistades, especialmente a Elizabeth, Eva, Suje, Caro, Axel, Diego, Millo y Humberto por todos los momentos compartidos, las experiencias vividas y por haberse convertido en una hermosa familia postiza.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	v
ÍNDICE DE CUADROS .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
.....	viii
RESUMEN .....	ix
INTRODUCCIÓN .....	1
OBJETIVO GENERAL.....	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
HIPÓTESIS .....	4
ANTECEDENTES .....	5
1. Microorganismos en el suelo y sus interacciones con las plantas.....	5
1.1. Microorganismos en la rizósfera.....	6
1.2 Modo de acción de los microorganismos en la rizósfera de las plantas.....	9
2. Microorganismos rizosféricos promotores del crecimiento vegetal.....	10
3. Uso de los microorganismos promotores de crecimiento vegetal en la agicultura.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
Lavado y desinfección de las semillas .....	20
Inoculación de las semillas con <i>Azospirillum brasilense</i> y <i>Glomus intraradices</i> .....	20
Preparación del sustrato y llenado de charola de germinación. ....	21
Siembra y trasplante para la fase de colonización de la raíz. ....	22
Fase de colonización de la raíz.....	22
Colonización de la raíz por <i>Azospirillum brasilense</i> .....	22
Colonización de la raíz por <i>Glomus intraradices</i> .....	24
Diseño experimental.....	25
Fase de promoción del crecimiento.....	25

Llenado de macetas y trasplante para la fase de promoción del crecimiento. ....	25
Medición de variables agronómicas de crecimiento.....	26
Diseño experimental.....	26
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>28</b>
Fase de colonización de la raíz.....	28
Colonización de la raíz por <i>Azospirillum brasilense</i> .....	28
Colonización de la raíz por <i>Glomus intraradices</i> .....	31
Fase de promoción del crecimiento.....	37
Altura de la planta.....	37
Número de hojas .....	38
Área foliar .....	39
Peso seco del tallo .....	42
Peso seco de la raíz.....	43
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>45</b>
<b>LITERATURA CITADA .....</b>	<b>46</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Comparación de medias de las Unidades formadoras de colonia de <i>Azospirillum brasilense</i> por gramo de raíz.....	28
Cuadro 2. Comparación de medias de las unidades formadoras de colonia de <i>Azospirillum brasilense</i> presentes en distintas partes de la raíz.....	30
Cuadro 3. Registro de la presencia o ausencia de <i>Glomus intraradices</i> en distintas partes de las raíces de las plántulas tratadas con dos tipos de biofertilizantes.....	32
Cuadro 4. Comparación de medias de la variable altura de plántulas de maíz a distintas edades tratadas con dos tipos de biofertilizantes.....	37
Cuadro 5. Comparación de medias de la variable número de hojas de plántulas de maíz a distintas edades tratadas con dos tipos de biofertilizantes.....	38
Cuadro 6. Comparación de medias de la variable área foliar de plántulas de maíz a distintas edades tratadas con dos tipos de biofertilizantes.....	40
Cuadro 7. Comparación de medias de la variable peso seco de hojas de plántulas de maíz a distintas edades tratadas con dos tipos de biofertilizantes.....	41
Cuadro 8. Comparación de medias de la variable peso seco de tallo de plántulas de maíz a distintas edades tratadas con dos tipos de biofertilizantes.....	42
Cuadro 9. Comparación de medias de la variable peso seco de raíz de plántulas de maíz a distintas edades tratadas con dos tipos de biofertilizantes.....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Vistas de las raíces micorrizadas de las plántulas tratadas con *Glomus intraradices* evaluadas a los 30 días después de la siembra.....34
- Figura 2. Vistas de las raíces micorrizadas de las plántulas tratadas con *Glomus intraradices* evaluadas a los 45 días después de la siembra.....35
- Figura 3. Vistas de las raíces micorrizadas de las plántulas tratadas con *Azospirillum brasilense* + *Glomus intraradices* evaluadas a los 45 días después de la siembra.....36



## RESUMEN

La presente investigación se realizó en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, situada en la ciudad de Saltillo, Coahuila, México. Se llevaron a cabo dos fases de evaluación para determinar la capacidad de algunos microorganismos de colonizar la raíz del cultivo de maíz y promover su crecimiento y desarrollo a nivel de plántula. Se inocularon y sembraron semillas de maíz con los tratamientos *Azospirillum brasilense*, *Glomus intraradices*, *A. brasilense* + *G. intraradices*, testigo comercial a base de *Azospirillum* y testigo sin inoculación, bajo un diseño completamente al azar con tres repeticiones para evaluar la colonización de la raíz y cinco repeticiones para la evaluación de la capacidad de promoción del crecimiento. Las variables consideradas fueron la presencia y número de colonias de *A. brasilense* a tres alturas de la raíz; presencia/ausencia de *G. intraradices* a tres alturas de la raíz; altura de la planta, número de hojas, área foliar y pesos secos de raíz, tallo y hojas. A los 45 días después de la siembra se registró mayor presencia de colonias de *A. brasilense* en las raíces de las plantas tratadas con la combinación de *A. brasilense*+ *G. intraradices* con  $1.6 \times 10^7$  UFC También se observó presencia de *G. intraradices* en las plantas tratadas con *Glomus intraradices*. La parte de la raíz donde se registró más población fue la media con  $2.0 \times 10^7$  UFC. El tratamiento que indujo mayor altura y peso seco de hojas en las plantas fue la combinación de *A. brasilense* + *G. intraradices*. En las variables área foliar, peso seco del tallo y peso seco de la raíz, el tratamiento que generó los valores más altos fue *Azospirillum brasilense*. Se encontró que las poblaciones de ambos microorganismos se desarrollan mejor al estar en combinación. Además el crecimiento y desarrollo de las plántulas de maíz se ve favorecido con la aplicación de *Azospirillum brasilense* y *Glomus intraradices*, aunque este efecto no se distingue en las primeras etapas de desarrollo.

Palabras clave: *Azospirillum brasilense*, *Glomus intraradices*, promoción del crecimiento vegetal.

## INTRODUCCIÓN

En el suelo existe una gran diversidad de microorganismos, algunos de ellos establecen interacciones bióticas con las plantas que van desde relaciones antagónicas hasta mutualistas (Franklin *et al* 2016). Dentro de las relaciones antagónicas se encuentran microorganismos capaces de parasitar y enfermar a las plantas, tal es el caso de *Fusarium* sp y *Agrobacterium tumefaciens* y muchos otros (Geiser *et al*, 2013; Tzfira y Citovsky, 2007). En el caso de las relaciones mutualistas, algunos microorganismos que habitan en las raíces de las plantas como las bacterias *Bacillus* sp, han demostrado proteger a los cultivos agrícolas contra enfermedades, inducir su sistema de resistencia y promover el crecimiento y desarrollo de las plantas (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

La capacidad de algunos microorganismos de promover el crecimiento vegetal es una de las relaciones mutualistas entre microorganismos y planta, en la que se han enfatizado diversos estudios en distintos cultivos, Escobar *et al* (2011) aplicaron cepas bacterianas del género *Azotobacter* a plantas de tomate para evaluar su efecto en el desarrollo vegetativo de estas, obteniendo como resultado que las plantas inoculadas con las bacterias presentaron mayor altura, volumen de raíz y peso seco en comparación al testigo. Otro género de bacterias que demostró un efecto positivo en el crecimiento de plantas de arroz fue *Azospirillum*, el cual indujo mayor crecimiento en las plantas inoculadas comparadas con las testigo (Acebo *et al* , 2007). Núñez *et al* (2013), al aplicar una mezcla de *Azospirillum* con micorrizas, incrementaron el número de hojas de plantas de lechuga en mayor cantidad que con la aplicación de la bacteria solamente.

En el cultivo de maíz se han aplicado distintos géneros de microorganismos para promover un mejor crecimiento y desarrollo de las plantas así como incrementar su rendimiento. Obando *et al* (2013), probaron que la aplicación de la bacteria *Azotobacter chroococcum* induce el crecimiento de plantas del maíz de igual manera que algunos fertilizantes nitrogenados. Reyes *et al* (2008), registraron un mayor crecimiento en plantas de maíz inoculadas con *Azospirillum* spp, así como un mayor porcentaje de fósforo en el tejido foliar. García-Olivares *et al* (2012), al aplicar *Azospirillum brasilense* en maíz, obtuvieron una mejora en el rendimiento de grano en comparación con el testigo.

El empobrecimiento progresivo de los suelos ha provocado que cada vez de obtengan más bajos rendimientos en la producción de maíz, llevando con ello el incremento en el uso de fertilizantes minerales sintéticos para mejorar la producción de cultivo, aumentando los costos de producción y generando así una contaminación constante de los suelos.

Por esta razón, es necesario buscar alternativas que ayuden a reducir el uso de fertilizantes sintéticos, y en su lugar aplicar microorganismos que sean más amigables con el ambiente y promuevan el desarrollo y crecimiento de las plantas incrementando así el rendimiento de los cultivos.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad de algunos microorganismos benéficos para colonizar la raíz del cultivo de maíz y promover su crecimiento y desarrollo a nivel de plántula.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la capacidad de dos especies de microorganismos benéficos en el cultivo de maíz para colonizar las raíces de las plántulas.

Evaluar la aplicación de dos especies de microorganismos benéficos en semillas de maíz para determinar cuál induce un mayor crecimiento y desarrollo de la plántula.

## HIPÓTESIS

La inoculación de microorganismos benéficos en las semillas de maíz, incrementará el crecimiento y desarrollo de las plántulas.

## ANTECEDENTES

### 1. Microorganismos en el suelo y sus interacciones con las plantas.

El suelo es la capa de la corteza terrestre que se ha ido formando a través del tiempo, debido a diversas y complejas interacciones entre factores abióticos como el clima, la topografía y la roca madre; y factores bióticos que incluyen animales, plantas y microorganismos (FAO, 1996; Turkington *et al* , 2004).

Dentro de las relaciones complejas que han sido parte del proceso de formación de suelo, se encuentra la interacción entre los microorganismos que están presentes en él.

De acuerdo con Paul y Clark (1996), el rol de los microorganismos en el suelo es esencial pues forman parte de procesos biogeoquímicos como la descomposición de la materia orgánica, la formación de humus, la transformación de nutrientes y la fijación de nitrógeno atmosférico, características que permiten el establecimiento de relaciones ecológicas entre los microorganismos presentes en el suelo y las plantas que se desarrollan en ese medio (Hernández- Acosta *et al* , 2006).

Rout y Southworth (2013), describen que al interactuar las plantas con los microorganismos se genera un microbioma, el cual comprende un conjunto de distintos microorganismos que se asocian a una planta en particular y pueden habitar en sus hojas, tallos, flores, semillas, tejidos y raíces.

La diversidad biológica de estos microbiomas ha sido estudiada con mayor exactitud a partir del desarrollo de técnicas moleculares, lo que ha permitido conocer los grupos filogenéticos de los microorganismos que los componen, Hugenholtz *et al* (1998), realizaron un análisis de diversidad de bacterias

cultivables presentes en distintos ambientes, basándose en registros de estudios anteriores encontrando que en el suelo se ha reportado la presencia de *αProteobacterias*, *Actinobacterias*, *Acidobacterias*, *Verrucomicrobias*, *Firmicutes*, *Planctomycetes* entre otros. Por su parte, Postma *et al* (2016) realizando un análisis de diversidad de microorganismos en el suelo cercano a las raíces de plantas, encontraron además de los mencionados anteriormente algunos otros que pertenecen a los grupos de los *Sphingobacteriales*, *Xanthomonadales* y *Rhizobiales*.

Los microbiomas que han sido mayormente estudiados en la relación planta-microorganismo son los que se desarrollan en las raíces y alrededor de ellas, ya que en esta zona se han caracterizado bacterias y hongos que pueden influir de manera positiva o negativa en el crecimiento y desarrollo de la planta (Lakshmanan *et al* , 2014).

#### 1.1. Microorganismos en la rizósfera

La presencia de microorganismos en la rizósfera depende principalmente de la liberación de exudados de la raíz y la composición química de estos, los que tienen como función principal alimentar a los microorganismos (Lugtenberg y Bloemberg, 2004).

Para entender el proceso de colonización de la rizósfera se han realizado algunos estudios para conocer la composición de los compuestos excretados por las raíces de las plantas, Kamilova *et al* (2006) realizaron el análisis de las excreciones de las raíces de tomate, chile pimiento y pepino, obteniendo como resultado que los principales componentes de los exudados son ácidos

orgánicos entre los que se encuentran el ácido cítrico, el ácido málico y el ácido sulfúrico, el segundo grupo de compuestos con mayor presencia fueron los azúcares, siendo la fructosa y la glucosa los más representativos; registraron también la presencia del aminoácido L-Triptófano.

La composición de los exudados de las raíces varían como respuesta de la planta a los cambios ambientales, Badri y Vivanco (2009), enlistan distintos compuestos liberados por las raíces de las plantas entre los que se encuentran carbohidratos, ácidos orgánicos, aminoácidos, flavonoides, ligninas, antocianinas, cumarinas, compuestos de indol, ácidos grasos, esteroides, enzimas y proteínas.

La diversidad y abundancia microbiana en el área de la rizósfera es mayor a la del suelo, de acuerdo con Pinton *et al* (2007) el número de células microbianas por gramo de suelo de la rizósfera va de  $10^9$  a  $10^{12}$ , mientras que en la mayor parte del suelo el número de células microbianas se reduce a la mitad.

Se han realizado numerosas investigaciones para identificar las especies de microorganismos presentes en la rizósfera de distintas plantas, Cordero *et al* (2016) analizaron la diversidad microbiana de la rizósfera de *Vachellia macracantha* una especie de árbol silvestre perteneciente al grupo de las fabáceas, encontraron bacterias de los géneros *Ensifer* y *Rhizobium*; Wu *et al* (2016) aislaron bacterias de la rizósfera de tabaco y observaron que los grupos dominantes fueron *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*,



*Gemmatimonadetes* y *Actinobacteria*. En otro estudio realizado por Soroa-Bell *et al* (2009) se aislaron los microorganismos de la rizósfera de *Gerbera jamesonii*, obteniendo cinco especies de hongos de los géneros *Glomus* y *Scutellospora* y cuatro géneros dominantes de bacterias que fueron *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Bacillus* y *Streptomyces*.

Por otro lado Luna *et al* (2013), aislaron distintas especies del género *Bacillus* a partir de la rizósfera de tomate. En la rizósfera del sorgo Haiyambo *et al* (2015), aislaron bacterias pertenecientes a los géneros *Stenotrophomonas*, *Paenibacillus*, *Bacillus* y *Enterobacter*.

En las plantas de maíz también se han realizado estudios para conocer los microorganismos que habitan en su rizósfera, Hernández *et al* (2004) trabajando con rizósfera de maíz, encontraron *Pseudomonas fluorescens* y *Buclodera cepacia*, en otra investigación Carcaño-Montiel *et al* (2006) lograron aislar bacterias de los géneros *Azospirillum* y *Klebsiella*.

En el trabajo realizado por Vital *et al* (2015), pudieron aislar e identificar los grupos de bacterias de los géneros *Sphingobium*, *Microbacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Brevundimonas*, *Sinorhizobium*, *Serratia* y *Agrococcus*. Por su parte Pérez-Luna *et al* (2012), buscando conocer la diversidad de hongos en la rizósfera del maíz encontraron la presencia de dos géneros dominantes, *Glomus* y *Acaulospora*.

En otro análisis de diversidad de hongos en la rizósfera de maíz Bustamante y Zambrano (2015), identificaron hongos de los géneros *Glomus*, *Acaulospora*, *Archaeospora*, *Gigaspora* y *Entrophospora*.

## 1.2 Modo de acción de los microorganismos en la rizósfera de las plantas

Algunos de los microorganismos que habitan en las rizósferas de las plantas establecen relaciones simbióticas con ellas, lo que genera efectos positivos que permiten la sobrevivencia de los microorganismos y el crecimiento y desarrollo de las plantas (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

Dentro del estudio de los microorganismos presentes en la rizósfera, se ha enfatizado en la caracterización de bacterias rizosféricas, de las cuales se ha demostrado tienen distintos mecanismos para promover el crecimiento y desarrollo de las plantas; Van Loon (2007) describe algunos de estos mecanismos, mencionando la fijación de nitrógeno, la absorción de iones y micronutrientes esenciales, la producción de hormonas vegetales y la modulación del crecimiento mediante la activación de enzimas.

Otro mecanismo utilizado por las bacterias rizosféricas es la inhibición de patógenos que afectan a la planta, Haas y Défago (2005) describen que dentro de los mecanismos de inhibición de patógenos se encuentran la producción de antibióticos, antifúngicos y la inducción del sistema de resistencia de la planta, Harman *et al* (2004), mencionan que también existe parasitismo.

## 2. Microorganismos rizosféricos promotores del crecimiento vegetal

La caracterización de las bacterias rizosféricas ha demostrado que la principal relación simbiótica entre planta y microorganismo es la promoción de crecimiento vegetal. Dentro de los estudios realizados se han buscado las capacidades de las bacterias para estimular el crecimiento de las plantas de manera directa e indirecta, como la fijación de nitrógeno, la producción de hormonas vegetales, la inducción del sistema de resistencia, la inhibición de fitopatógenos entre otros.

Con respecto a la capacidad de inhibición de fitopatógenos, se han encontrado hongos y bacterias con la cualidad de inhibir el crecimiento de microorganismos dañinos para las plantas, Hend y Perveen (2012) demostraron que los hongos *Aspergillus niger*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium* sp. y *Trichoderma harzianum* inhibieron el crecimiento radial del hongo fitopatógeno *Fusarium* sp hasta en un 70%.

Quiroz-Sarmiento *et al* (2008) evaluaron la capacidad antagónica de 22 cepas de hongos contra hongos fitopatógenos de los géneros *Penicillium* sp y *Fusarium* sp, obteniendo como resultado que las cepas que inhibieron en mayor proporción fueron cepas pertenecientes a hongos de los géneros *Aspergillus* sp y *Trichoderma* sp.

Se han encontrado también bacterias capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos fitopatógenos, Flores *et al* (2014) reportaron que las bacterias de los géneros *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* y *Bulkhoderia cepacia* inhiben el crecimiento de los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora infestans*, por otro lado Bajsa *et al* (2005)

utilizando cepas bacterianas de *Pseudomonas fluorescens* lograron inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos del género *Pythium* y *Rhizoctonia* argumentando que esta inhibición se debió a la capacidad de *P. fluorescens* para producir ácido cianhídrico, sideróforos, antibióticos, biosurfactantes y exoproteasas.

En cuanto a la capacidad para promover el crecimiento de plantas se han caracterizado distintos géneros y especies de bacterias, que van desde bacterias promotoras muy poco estudiadas, como los mencionados por Chauhan *et al* (2015), quienes realizando una revisión extensa encontraron que las bacterias de los géneros *Azoarcus*, *Exiguobacterium*, *Methylobacterium*, *Paenibacillus* y *Pantoea* poseen las capacidades de fijar nitrógeno, solubilizar fósforo, producir fitohormonas, inducir el sistema de resistencia, producir antibióticos e inducir la actividad de enzimas como ACC deaminasa, hasta géneros comúnmente estudiados como las bacterias del género *Bacillus* las que también han sido evaluadas por su capacidad de promover el crecimiento vegetal,.

Chagas *et al* (2015), evaluaron la capacidad de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus* para producir ácido indolacético obteniendo como resultado que el 60% de las cepas aisladas y evaluadas produjeron concentraciones de esta auxina de hasta más de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Por otro lado Luna *et al* (2013) en distintas cepas del género *Bacillus* registraron una producción de ácido indolacético de 0.9 a  $2.3 \text{ mg L}^{-1}$ , una solubilización de fósforo tricálcico de 18.5 a  $34.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y encontraron actividad ACC deaminasa.

Otros de los géneros de bacterias estudiados en mayor medida por sus características promotoras de crecimiento son *Azotobacter* y *Azospirillum*, Escobar *et al* (2011), aislaron y caracterizaron cepas bacterianas del género *Azotobacter* y obtuvieron que este grupo de bacterias fijaron una cantidad de nitrógeno de 0.13 a 1.64 mgL<sup>-1</sup> fijado como amonio, produjeron la cantidad de 7.10 a 57.99 mgL<sup>-1</sup> de ácido indolacético y solubilizaron roca fosfórica con una eficiencia de hasta 1.61 %; García *et al* (2010) analizaron la capacidad de cepas bacterianas del género *Azospirillum* para producir ácido indolacético y fijar nitrógeno, encontrando una producción de 2.69 a 38.02 ppm de ácido indolacético y 7.95 a 29.09 ppm de nitrógeno fijado. En otro estudio realizado por Lara *et al* (2007), sobre cepas de *Azotobacter* y *Azospirillum* se cuantificó una producción de amonio de 0.9 hasta 5.2 mg/l siendo el género *Azotobacter* del que se registraron mayores cantidades de amonio.

Por su parte Cárdenas *et al* (2010) aislaron y caracterizaron cepas bacterianas del género *Azospirillum* a partir de la rizósfera de pasto guinea comprobando que es un grupo de bacterias capaces de fijar nitrógeno y producir sustancias indólicas de hasta 45 µg·ml<sup>-1</sup>

### 3. Uso de los microorganismos promotores de crecimiento vegetal en la agricultura

A partir del descubrimiento de los beneficios que los microorganismos rizosféricos proporcionan a las plantas, comenzaron a utilizarse en la agricultura, por sus cualidades para inhibir el crecimiento de algunos fitopatógenos se han empleado en el control biológico de enfermedades y por

su capacidad de fijar nitrógeno, solubilizar fósforo y producir hormonas vegetales se han empleado como biofertilizantes, proporcionando una alternativa al uso de agroquímicos en el manejo de los cultivos (Aguirre-Medina, 2006).

La aplicación de estos microorganismos se ha realizado en una amplia gama de cultivos, para combatir enfermedades en las plantas, Tejera *et al* (2012) probaron la actividad antagónica de siete aislados de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* contra los hongos fitopatógenos del cultivo del arroz *Curvularia* sp. y *Pyricularia grisea*, obteniendo altos índices de inhibición de crecimiento de los hongos.

En otra investigación realizada por Chandel *et al* (2010), se puso a prueba la capacidad de *Brevibacillus brevis* para inhibir el crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum* en el cultivo de tomate, encontrando que esta bacteria es un agente potencial para disminuir el daño que causa *Fusarium oxysporum* en las plantas, por su parte Hammami *et al* (2013), evaluaron bacterias del género *Pseudomonas* spp contra los hongos fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata* y *Rhizoctonia solani*, causantes de la enfermedad conocida como damping-off en plantas de tomate, encontrando que estas bacterias pueden ayudar a inhibir hasta en un 70% el crecimiento de los hongos.

Su uso como biofertilizantes ha sido muy variado pues se han aplicado en cultivos ornamentales, hortícolas y de granos con el fin de promover el crecimiento, desarrollo y en algunos casos el rendimiento de las plantas.

En cultivos ornamentales, Norberto (2011) evaluó el potencial de *Pseudomonas putida* para estimular el crecimiento de plantas de nochebuena reportando que estas bacterias logaron una respuesta favorable en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Ali *et al* (2014), aplicaron bacterias del género *Rhizobium* y *Azotobacter* en plantas de gladiola, registrando que la incorporación de estos microorganismos estimularon de manera positiva el crecimiento de las plantas e incrementaron el número de floretes por planta.

En otra investigación realizada en plantas de girasol, Dhanasekar y Dhandapani (2012), utilizaron bacterias de los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Phosphobacter* y *Rhizobacter* para evaluar su efecto sobre el crecimiento y rendimiento, obteniendo como resultado que la aplicación de bacterias incrementó hasta 45.87% el crecimiento y hasta en 90% el rendimiento de las plantas.

En plantas de crisantemo Panchal *et al* (2010), probaron una combinación de *Azotobacter* y *Azospirillum* con distintas dosis de nitrógeno, con estos tratamientos encontraron que la combinación de ambos biofertilizantes con 175 kg/ha de nitrógeno logan inducir plantas con mayor altura, mayor área foliar y mayor número de botones florales; por su parte Jayamma *et al* (2014) trabajando con plantas de jazmín reportaron que la aplicación de un consorcio de *Azospirillum*, *Pseudomonas striata*, *Pseudomonas fluorescens* y *Trichoderma viridae* junto con 50% de NPK estimulan en crecimiento de la planta y mantienen su calidad de misma manera que una aplicación de 100% de NPK.

En los cultivos hortícolas también se ha realizado la aplicación de distintos microorganismos con función de biofertilizantes, Santillana *et al* (2005) probaron la capacidad de cepas bacterianas de la especie *Rhizobium* para estimular la germinación de semillas de tomate y promover el crecimiento de las plantas, registrando un efecto positivo en la germinación y el crecimiento de las plantas, otro género de bacterias aplicadas a plantas de tomate para estimular su crecimiento es *Azotobacter* spp, en una investigación realizada por Escobar *et al* (2011) al aplicar este género de bacterias, demostraron que al inocular un consorcio de cepas de bacterias de *Azotobacter* spp se redujeron los días para la floración de las plantas, y aumentaron la altura y biomasa total de las plantas comparadas con la aplicación individual de cada cepa.

En el cultivo de chile Neyra *et al* (2013), inocularon *Rhizobium etli* y *Trichoderma viride*, obteniendo plantas con mayor longitud, peso húmedo y peso seco en las raíces de las plantas que fueron inoculadas con los microorganismos, otra aplicación de microorganismos promotores del crecimiento vegetal en el cultivo de chile fue realizada por Guigón-López y González-González (2004), quienes utilizaron cepas del hongo *Trichoderma* spp y encontraron que al aplicar este microorganismo en las plantas de chile se aumentaron en un 30% la altura de las plantas y el área foliar, 60% la biomasa de la raíz y el número de yemas y flores aumentó de 40 a 60%.

Los géneros de las bacterias *Bacillus* spp y *Pseudomonas* spp han sido probados también para probar su capacidad como biofertilizantes, Sepúlveda (2013), al inocular semillas de lechuga con cepas de estas bacterias registraron una aumento en el volumen radicular de las plantas.



En los cultivos de grano se han investigado también los efectos que produce el aplicar microorganismos que proveen nutrientes a las plantas, en trigo García y Bach (2009) inocularon cepas de la bacteria *Pseudomonas* spp durante tres años para observar de qué manera actuaban sobre las plantas y si eran capaces de incrementar el rendimiento del grano al pasar el tiempo registrando un aumento en el rendimiento del año en que se estableció el experimento al tercer año, logando un incremento medio y consistente de 309, 6 kg ha<sup>-1</sup>.

Para el cultivo de arroz en una prueba in vitro realizada por Rives *et al* (2009), se aplicaron cepas de la bacteria *Pseudomonas putida* a plántulas de arroz para evaluar su efecto en el crecimiento de estas, obteniendo como resultado que las plántulas a las que se les aplicó la bacteria tuvieron una mayor altura y longitud de raíz comparadas con las plántulas testigo.

En una investigación en cultivo de frijol realizada por López (2013) se aplicaron aislados de los géneros *Bacillus* y *Streptomyces* a semillas y plántulas de frijol para analizar su efecto en la promoción de crecimiento del cultivo encontrando que algunos de los aislados fueron capaces de incrementar el peso seco de la parte aérea y de las raíces de las plantas.

Otro trabajo realizado por García-Olivares *et al* (2006) demostró que el uso de *Azospirillum brasilense* en el cultivo de sorgo aumento hasta en un 50% la producción de biomasa de las plantas y el rendimiento del grano incremento en promedio entre un 13 y 17% en comparación a las plantas sin inoculación.

El maíz es uno de los cultivos hortícolas y de grano con mayor importancia alimenticia y económica para diversos países, en este cultivo se han realizado también aplicaciones de distintos microorganismos para probar su capacidad

como biofertilizantes, Reyes y Valery (2007), inocularon semillas de maíz con dos cepas de bacterias del género *Azotobacter* y compararon el efecto de estas con fertilización química obteniendo como resultado que una de las cepas bacterianas incremento el peso seco de las plantas en comparación a algunos tratamientos de fertilización química.

En otro trabajo realizado por Sánchez-Yañez *et al* (2014) comprobaron que el uso de *Azotobacter* y *Burkholderia* adicionadas a una baja fertilización nitrogenada incrementaron significativamente el peso seco de la raíz en comparación a plantas con fertilización química y la promoción del crecimiento y la floración fueron positivas al utilizar estas bacterias.

Dos de los microorganismos que se han evaluado con mayor frecuencia en el cultivo de maíz son las bacterias del género *Azospirillum* y los hongos del género *Glomus*, en un trabajo realizado por Uribe y Dzib (2006) se comparó la eficiencia en el rendimiento del maíz al ser fertilizado con productos agroquímicos convencionales y con los biofertilizantes *Azospirillum brasilense* y *Glomus intraradices*, encontrando que el uso de biofertilizantes proporciona plantas con crecimiento y rendimiento similares a las plantas con fertilización química y superiores al testigo absoluto.

Robles y Barea (2004), al aplicar estos dos microorganismos en un cultivo de maíz bajo condiciones de invernadero y evaluar el comportamiento de las plantas por cinco ciclos consecutivos, observaron que la altura de las plantas inoculadas fue mayor solo en el primer ciclo, la producción de biomasa en cada ciclo de cultivo y acumulada fue mayor en los tratamiento inoculados y que con el tiempo las diferencias entre las variables de las plantas inoculadas y las no

inoculadas fueron reduciendo, por su parte González *et al* (2011) evaluaron la respuesta de las plantas de maíz al complementar la fertilización química con *Azospirillum brasilense* encontrando que al incorporar esta bacteria a distintas dosis de fertilización hubo un aumento promedio en el rendimiento de 1.47 t ha<sup>-1</sup> y una reducción promedio de dos días en el ciclo biológico del cultivo.

Díaz *et al* (2005) inocularon semillas de maíz con estos dos microorganismos y analizaron la producción de gano y elote, teniendo como resultado que la aplicación individual de *A. brasilense* y *G. intraradices* incrementaron significativamente la producción de elote y gano e incluso igualaron o superaron al testigo fertilizado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, situada en la ciudad de Saltillo en Coahuila, México. Se llevaron a cabo dos fases de evaluación, la primera consistió en la evaluación de la capacidad de los microorganismos promotores de crecimiento para colonizar la raíz de las plantas, la segunda fase fue la evaluación de la capacidad de estos microorganismos para promover el crecimiento y desarrollo de las plantas a nivel de plántula.

La fase número uno se realizó en el Laboratorio de Biología situado en el Departamento de Botánica y en el Laboratorio de Investigación ubicado en el Departamento de Ciencias Básicas, ambos Departamentos se encuentran dentro de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

La segunda fase se desarrolló en el invernadero número dos del Departamento de Subdirección de Operación de Proyectos de la misma Universidad y en el Laboratorio de Fisiología Vegetal. El laboratorio se encuentra ubicado dentro del Departamento de Fisiología Vegetal y el invernadero se encuentra a un costado de este departamento.

El invernadero tiene una orientación norte-sur, un área total de 240 m<sup>2</sup>, y una temperatura promedio de 28°C, es un invernadero tipo túnel con una cubierta de acrílico. Cuenta con dos extractores al frente y un muro húmedo en la parte posterior.

Para realizar esta investigación se inocularon semillas de maíz de la variedad AN447-2015 con la bacteria *Azospirillum brasilense* y con el hongo *Glomus intraradices* para ser sembradas posteriormente.

#### Lavado y desinfección de las semillas

Para poder inocular las semillas con los microorganismos ya mencionados, fue necesario lavarlas y desinfectarlas. El proceso de lavado y desinfección de las semillas se llevó a cabo dentro de una campana de flujo laminar, se colocaron 250 semillas de maíz en un matraz Erlenmeyer con capacidad de 500 ml, a estas semillas se les agregaron 200 ml de una solución de TWEEN 20 al 2 %, el matraz se agito de manera manual durante 10 minutos, después se enjuagaron 10 veces con agua destilada, luego de enjuagarlas se lavaron con 200 ml de etanol al 96% durante un minuto manteniendo el matraz en agitación, pasado el minuto se retiró el etanol y se incorporaron 200 ml de hipoclorito de sodio agitando durante cinco minutos, concluido el tiempo las semillas se enjuagaron cinco veces con una solución estéril de tiosulfato de sodio al 2% y finalmente se enjuagaron 10 veces con agua destilada estéril. Se dejaron secar completamente dentro de la campana de flujo laminar para después continuar con la adhesión de los microorganismos.

#### Inoculación de las semillas con *Azospirillum brasilense* y *Glomus intraradices*

Para adherir *Azospirillum brasilense* a las semillas de maíz se preparó una solución de goma arábica al 1%, a esta solución se le agregaron 20 gotas de colorante vegetal azul. Se tomaron 9ml del producto de *A. brasilense* y se les agregó 1 ml de la solución de goma arábica, se mezcló bien, se colocaron 50 semillas en una bolsa de polipapel, a estas semillas se les agregaron 2 ml de la

mezcla de goma y *A. brasilense*, se inflo y cerro la bolsa y se agito vigorosamente hasta que las semillas se tiñeron de azul, después de esto las semillas se dejaron secar al aire.

Para inocular *Glomus intraradices*, se agregaron 5 ml del producto de *G. intraradices* a 45 ml de la solución de goma arábica al 1% diluida al 0.1%, se mezcló bien y se colocaron 2ml de esta preparación a 50 semillas de maíz dentro de una bolsa de polipapel, se inflo y cerro la bolsa y se agito vigorosamente hasta que la semilla tomo el color de la preparación de *G. intraradices*, una vez terminado esto las semillas se dejaron secar al aire.

Para las semillas destinadas al tratamiento testigo absoluto se realizó un procedimiento similar a los anteriores, la diferencia fue que para estas semillas no se utilizó ningún microorganismo para la preparación, solamente se les coloco la solución de goma arábica al 1%.

Preparación del sustrato y llenado de charola de germinación.

Para sembrar las semillas se preparó una mezcla de suelo agrícola sin esterilizar, peat moss y perlita en una proporción en volumen de 1-1-1, se utilizó suelo agrícola proveniente del área de invernaderos de Investigación de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Para realizar la mezcla se fueron colocando uno a uno los sustratos hasta formar una pila, esta pila se revolvió varias veces hasta que la mezcla se tornó homogénea, se humedeció el sustrato hasta un punto de saturación.

De la mezcla recién humedecida se utilizó una pequeña parte para llenar dos charolas de poliestireno para siembra de 200 cavidades, el resto del sustrato se dejó reposar durante 24 horas.

Siembra y trasplante para la fase de colonización de la raíz.

Una vez realizado el proceso de inoculación las semillas se sembraron en las charolas de poliestireno, colocando una semilla por cavidad, se taparon las semillas por completo con el sustrato y se colocaron en una cámara de germinación PCON Instrument modelo Mgc-250, con un fotoperiodo de 12 horas, una temperatura máxima de 28°C y mínima de 22°C. Cuatro días después de la emergencia de las plántulas, estas se trasplantaron en macetas y fueron llevadas al invernadero. Para la fase de evaluación de la capacidad de colonización de la raíz, se llenaron 45 macetas de unicel con capacidad de un litro.

Fase de colonización de la raíz

Para comprobar que los microorganismos adheridos en las semillas permanecen en las raíces de las plantas se realizaron dos pruebas.

Colonización de la raíz por *Azospirillum brasilense*

Para observar la permanencia de *A. brasilense*, se realizaron suspensiones seriadas utilizando el método de siembra por gota de la raíz del maíz a tres alturas, para ello se retiraron las plantas de la maceta y con cuidado se quitó exceso de suelo de las raíces, se separaron las raíces de cada planta en tres partes, las raíces cercanas a la semilla, las raíces de la parte media y las raíces del ápice. De cada una de estas partes se pesaron 0.2 g y se colocaron en

matraces Erlenmeyer con capacidad de 125 ml, se les agregaron 20 ml de una solución de NaCl al 0.85% estéril, se colocaron en un agitador orbital marca Thermo scientific modelo MaxQ 5000 a 200 rpm durante 15 minutos.

Para realizar las diluciones, en una microplaca de 96 pozos se colocaron 180  $\mu\text{L}$  de la solución de NaCl al 0.85% estéril, se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de la suspensión de las raíces y se agregaron en el primer carril de la microplaca, para tener la primera dilución con una concentración de  $10^{-1}$ , se mezcló muy bien con una micropipeta, de esta mezcla se tomaron 20  $\mu\text{L}$  y se colocaron en el siguiente carril para obtener la dilución  $10^{-2}$ , se continuo con este procedimiento hasta llegar a la dilución  $10^{-4}$ .

Una vez realizadas las diluciones se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de cada una en cajas Petri con medio de cultivo rojo congo. Terminada la siembra en el medio, se sellaron las cajas y se pusieron en una incubadora marca NOVATECH modelo EI35-AIA durante 72 horas a una temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$ .

En las gotas de la dilución  $10^{-3}$  con el crecimiento bacteriano que permitió cuantificar con certeza las colonias, se realizó el conteo en cada una de las repeticiones de esta dilución. Para obtener el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de suspensión se aplicó la siguiente formula:

$$\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1} = \text{promedio de colonias} * 50 * \text{dilución}$$

Para obtener el número de colonias de *Azospirillum* se tomaron en cuenta solamente las colonias que se tiñeron de rojo, la fórmula aplicada para calcular las UFC de *Azospirillum* fue la misma que se utilizó anteriormente.



El cálculo del número de UFC por gamo de raíz se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}\text{ raíz} = \frac{(\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1})\cdot\text{ml totales de suspensión}}{\text{g de raíz colocada en la suspensión}}$$

Colonización de la raíz por *Glomus intraradices*.

Para observar la presencia de *G. intraradices* se utilizó la técnica de tinción de micorriza con azul de Tripano.

Las raíces restantes de la prueba para *A. brasilense* se lavaron al chorro de agua hasta que quedaron limpias, se seleccionaron al azar tres pedazos del cuello de la raíz, tres de la zona de ramificación y tres de la zona de alargamiento. Estos pedazos de raíz se cortaron en trozos de cuatro centímetros y se colocaron en tubos de 50 ml etiquetados de acuerdo a la zona de la raíz de donde fueron tomados. Las raíces se sumergieron en una solución de hidróxido de potasio al 10% a 90 °C durante 20 minutos, después se decantaron y se lavaron dos veces con agua destilada, luego se sumergieron en una solución de lactoglicerol con azul de tripano a 90 °C de tres a cinco minutos, de aquí se pasaron a glicerol, las raíces se cortaron en trozos de un centímetro y utilizando glicerol se montaron en los portaobjetos para observarlos en un microscopio Motic modelo BA210E e identificar la presencia de *Glomus*.

## Diseño experimental

La distribución de los tratamientos tanto en la charola de germinación como en las macetas fue completamente al azar. Se evaluaron cinco tratamientos con tres repeticiones cada tratamiento.

Los tratamientos evaluados fueron:

T1= Inoculación con *Azospirillum Brasilense*, T2= Inoculación con *Glomus intraradices*, T3= Inoculación con *Azospirillum brasilense* + *Glomus intraradices*, T4= Inoculación con un testigo comercial (a base de *Azospirillum*), T5= Sin inoculación.

Las variables evaluadas en esta fase fueron la presencia y número de colonias de *A. brasilense* a tres alturas distintas de la raíz. Presencia/ ausencia de *G. intraradices* a tres alturas distintas de la raíz de las plantas de maíz.

## Fase de promoción del crecimiento

La evaluación del efecto que estos microorganismos tienen en el crecimiento de las plántulas de maíz se hizo durante dos y medio meses, realizando mediciones de distintas variables agronómicas de crecimiento.

Llenado de macetas y trasplante para la fase de promoción del crecimiento.

Transcurridas las 24 horas de reposo del sustrato preparado anteriormente, se procedió al llenado de macetas para la fase de promoción de crecimiento y desarrollo. Se llenaron 75 macetas de polietileno negro con capacidad de tres litros. Luego del llenado las macetas fueron transportadas al invernadero. A los cuatro días después de la emergencia se realizó el trasplante. El sustrato colocado

en las macetas se humedeció antes para poder realizar el trasplante de las plántulas.

Medición de variables agronómicas de crecimiento.

Para realizar las evaluaciones en esta fase se midieron las alturas de las plantas seleccionadas para cada fecha, después se retiraron de las macetas quitando cuidadosamente el exceso de sustrato de la raíz, se colocaron en bolsas de polipapel previamente etiquetadas y se transportaron al laboratorio.

Una vez en el laboratorio se contó el número de hojas de cada planta, posterior a esto las plantas se disectaron en hojas, tallo y raíz. Las hojas fueron puestas en una prensa botánica para después medir su área foliar en un medidor de área foliar Li-cor inc. Modelo LI-3100. Hojas, tallos y raíces de cada planta se colocaron en bolsas de papel con sus respectivas etiquetas y se pusieron en una estufa de secado Quincy lab Inc modelo 12-140, a 50°C durante dos días. Ya secas las partes de las plantas se pesaron en una balanza analítica A&D modelo G-120.

La primera evaluación se realizó a los 26 días después de la emergencia y las cuatro restantes en lapsos de 15 días.

Diseño experimental

La distribución de los tratamientos fue completamente al azar. Se evaluaron cinco tratamientos con cinco repeticiones cada tratamiento.

Los tratamientos evaluados fueron:

T1= Inoculación con *Azospirillum Brasilense*, T2= Inoculación con *Glomus intradices*, T3= Inoculación con *Azospirillum brasilense* + *Glomus intradices*, T4= Inoculación con un testigo comercial (a base de *Azospirillum*), T5= Sin inoculación.

Las variables evaluadas en esta fase fueron la altura de las plantas, el número de hojas, el área foliar, el peso seco de hojas, peso seco de tallo y peso seco de la raíz.

Para el análisis estadístico de los datos se realizó un ANOVA y una prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ), utilizando el software estadístico InfoStat 2014.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Fase de colonización de la raíz

#### Colonización de la raíz por *Azospirillum brasilense*

El conteo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) de *Azospirillum brasilense*, revelo que existe permanencia de la bacteria en las raíces de las plantas después de haber sido adheridas a las semillas. En la variable UFC aunque estadísticamente no hubo diferencias significativas, en el Cuadro 1, se muestran las diferencias numéricas entre los tratamientos. En la primera evaluación realizada a los 30 días después de la siembra, la mayor cantidad de UFC de *Azospirillum* se registró en las plantas que fueron tratadas con *Azospirillum brasilense* y con la combinación de *Azospirillum brasilense* y *Glomus intraradices* obteniendo un total de  $5.0 \times 10^6$  UFC·g<sup>-1</sup> de raíz en cada tratamiento.

Cuadro 1: Comparación de medias de las Unidades formadoras de colonia de *Azospirillum brasilense* por gamo de raíz, contabilizadas en cada tratamiento.

Fecha de evaluación	Tratamiento	UFC·g <sup>-1</sup> raíz
Evaluación 1: 30/11/2016 30 DDS	<i>Azospirillum</i>	5.0x10 <sup>6</sup> a
	<i>Glomus</i>	3. x10 <sup>6</sup> a
	Azos+Glo	5.0x10 <sup>6</sup> a
	Testigo comercial	4.4x10 <sup>6</sup> a
	Testigo	5.6x10 <sup>5</sup> a
Evaluación 2: 15/12/2016 45 DDS	<i>Azospirillum</i>	1.5x10 <sup>7</sup> a
	<i>Glomus</i>	1.6x10 <sup>7</sup> a
	Azos+Glo	1.6x10 <sup>7</sup> a
	Testigo comercial	1.2x10 <sup>7</sup> a
	Testigo	1.4x10 <sup>7</sup> a

UFC= Unidades formadoras de colonia, Azos= *Azospirillum brasilense*, Glo= *Glomus intraradices*, DDS= días después de la siembra. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ )

Este resultado fue similar a lo reportado por Díaz *et al* (2001), quienes inocularon *Azospirillum brasilense* en semillas de lechuga para conocer sus efectos sobre las plantas y al evaluar la sobrevivencia de las bacterias en las raíces a los 60 días después de la siembra, registraron una población de  $3.1 \times 10^6$  UFC·g<sup>-1</sup>.

Por el contrario el resultado obtenido difiere con lo reportado por Aguirre-Cadena *et al* (2014) quienes probando la sobrevivencia de *Azospirillum*, inocularon semillas de trigo con cepas de *Azospirillum brasilense* y al realizar el conteo de las UFC a los 40 días después de la siembra, registraron un total de  $1 \times 10^{12}$  UFC·g<sup>-1</sup>.

La diferencia en la cantidad de UFC encontradas en ambos experimentos puede deberse a la desigualdad en edades de la planta, es decir en las plantas de trigo, las bacterias tuvieron mayor tiempo para estabilizarse y crecer en la rizósfera. Otro de los factores que puede influir en la cantidad de UFC en la rizósfera de las plantas es la especie de planta, que aunque en este caso ambas especies de plantas pertenecen a la familia de las gramíneas, los compuestos de los exudados de sus raíces pueden ser distintos y afectar o favorecer de manera diferente el crecimiento de las comunidades microbianas (Lugtenberg y Bloemberg, 2004).

A los 45 días después de la siembra el número de UFC de *Azospirillum* incremento en todos los tratamientos, siendo la combinación de *Azospirillum brasilense* y *Glomus intraradices* el tratamiento en el que se registró la mayor cantidad de UFC de *Azospirillum*, llegando hasta las  $1.6 \times 10^7$  UFC·g<sup>-1</sup> de raíz. A este tratamiento le siguió la inoculación con *Glomus intraradices* del cual se registraron  $1.6 \times 10^7$  UFC·g<sup>-1</sup> de raíz (Cuadro 1). Este resultado coincide con lo

descrito por Vázquez *et al* (2000) quienes al analizar las interacciones entre micorrizas arbusculares y microorganismos en la rizósfera de plantas de maíz, observaron que al inocular bacterias del género *Azospirillum* con micorrizas del género *Glomus* las poblaciones de *Azospirillum* crecen más en comparación con las plantas que no tienen micorriza.

En las plantas testigo se registró una cantidad de UFC de *Azospirillum* similar al de las plantas que recibieron tratamientos con esta cepa, esto se debió a que el sustrato utilizado para la siembra no esterilizo y probablemente contenía cepas nativas de *Azospirillum* que se adaptaron y desarrollaron adecuadamente.

En cuanto a la distribución de las bacterias en la raíz, los resultados mostraron que aunque no hubo diferencia estadística significativa entre las diferentes partes de la raíz a los 30 días después de la siembra, la mayor cantidad de bacterias se encontraron en el ápice de las raíces, en cambio en el muestreo a los 45 DDS la sección de la raíz en donde se encontró una mayor población fue en la parte media (Cuadro 2) encontrándose una diferencia estadística significativa.

Este resultado puede explicarse con la descripción que Paul y Clark (1996) realizaron acerca de la microbiología y bioquímica del suelo, en la cual mencionan que en general los microorganismos en las rizósferas de las plantas se mueven para acercarse a la comida y a una provisión de carbono orgánico.

Cuadro 2. Comparación de medias de las unidades formadoras de colonia de *Azospirillum brasilense* presentes en distintas partes de la raíz en el total de tratamientos

Fecha de evaluación	Parte de la raíz	UFC·g <sup>-1</sup> raíz
Evaluación 1: 30/11/2016 30 DDS	Ápice	1.1E+08 a
	Cuello	7.8E+07 a
	Medio	6.9E+07 a
Evaluación 2: 15/12/2016 45 DDS	Medio	2.0E+07 a
	Cuello	1.4E+07 ab
	Ápice	1.0E+07 b

UFC= Unidades formadoras de colonia. DDS= días después de la siembra. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ). Las partes de la raíz aparecen en orden descendente de acuerdo al número de UFC.

De acuerdo a las investigaciones realizadas por Bashan *et al* (2007) la colonización externa de las raíces sucede en la capa mucilaginosa que cubre la superficie radicular y *Azospirillum* se desarrolla más en zonas de elongación de la raíz y en pelos radiculares. Al ser el ápice la primera sección de la raíz en desarrollarse, es el primer plano a donde las bacterias pueden migrar para obtener alimento y continuar desarrollándose, al crecer la raíces y acumular mayor biomasa en la parte media las bacterias se desplazan a esta área.

#### Colonización de la raíz por *Glomus intraradices*

La evaluación de la presencia o ausencia de *Glomus intraradices*, mostró que esta micorriza se estableció y desarrolló de manera adecuada en las raíces de las plantas que fueron tratadas con esta cepa (Figuras 1, 2 y 3). En la evaluación realizada a los 30 días después de la siembra se registró presencia de *Glomus* en el 70% de las plantas que recibieron este tratamiento (Cuadro 3).



A los 45 días después de la siembra se observó presencia de *Glomus* en el 100% de las plantas que se inocularon con *Glomus intraradices*. Este resultado es similar al reportado por Fogar *et al* (2002) quienes al inocular diferentes especies de *Glomus* en plantas de maíz y evaluar el porcentaje de micorrización, encontraron que la especie que tuvo más presencia en las raíces de las plantas fue *Glomus intraradices*.

El resultado obtenido coincide también con lo descrito por Pérez-Luna *et al* (2011), quienes reportaron que al aplicar una combinación de *Glomus*+*Azospirillum* obtuvieron un porcentaje de colonización micorrizica del 57.3%, siendo este ligeramente mayor que el porcentaje registrado para el tratamiento en el que se aplicó *Glomus* solamente, del cual registraron un 56.8% de colonización.

Cuadro 3. Registro de la presencia o ausencia de *Glomus intraradices* en distintas partes de las raíces de las plantas tratadas con dos tipos de biofertilizantes.

Fecha de evaluación	Tratamiento	Parte de la raíz	Presencia	Ausencia
Evaluación 1: 01/12/2016 30 DDS	<i>Azospirillum</i>	Cuello		X
	<i>Azospirillum</i>	Medio		X
	<i>Azospirillum</i>	Ápice		X
	<i>Glomus</i>	Cuello	X	
	<i>Glomus</i>	Medio	X	
	<i>Glomus</i>	Ápice	X	
	Azos+Glo	Cuello	X	
	Azos+Glo	Medio		X
	Azos+Glo	Ápice		X
	Testigo comercial	Cuello		X
	Testigo comercial	Medio		X
	Testigo comercial	Ápice		X
	Testigo	Cuello		X
	Testigo	Medio		X
Testigo	Ápice		X	

Azos= *Azospirillum*, Glo= *Glomus* DDS= días después de la siembra. La cantidad de plantas por tratamiento evaluadas en cada fecha de muestreo fue de tres.

Cuadro 3 continuación. Registro de la presencia o ausencia de *Glomus intraradices* en distintas partes de las raíces de las plantas tratadas con dos tipos de biofertilizantes.

Fecha de evaluación	Tratamiento	Parte de la raíz	Presencia	Ausencia
Evaluación 2: 16/12/2016 45 DDS	<i>Azospirillum</i>	Cuello		X
	<i>Azospirillum</i>	Medio		X
	<i>Azospirillum</i>	Ápice		X
	<i>Glomus</i>	Cuello	X	
	<i>Glomus</i>	Medio	X	
	<i>Glomus</i>	Ápice	X	
	Azos+Glo	Cuello	X	
	Azos+Glo	Medio	X	
	Azos+Glo	Ápice	X	
	Testigo comercial	Cuello		X
	Testigo comercial	Medio		X
	Testigo comercial	Ápice		X
	Testigo	Cuello	X	
	Testigo	Medio		X
Testigo	Ápice		X	

Azos= *Azospirillum*, Glo= *Glomus* DDS= días después de la siembra. La cantidad de plantas por tratamiento evaluadas en cada fecha de muestreo fue de tres.

De igual manera Serralde y Ramírez (2004) al dar seguimiento al análisis de poblaciones de micorrizas en maíz, encontraron que el género de micorrizas con mayor presencia en las raíces del maíz fue *Glomus*, con hasta 83% de plantas colonizadas.

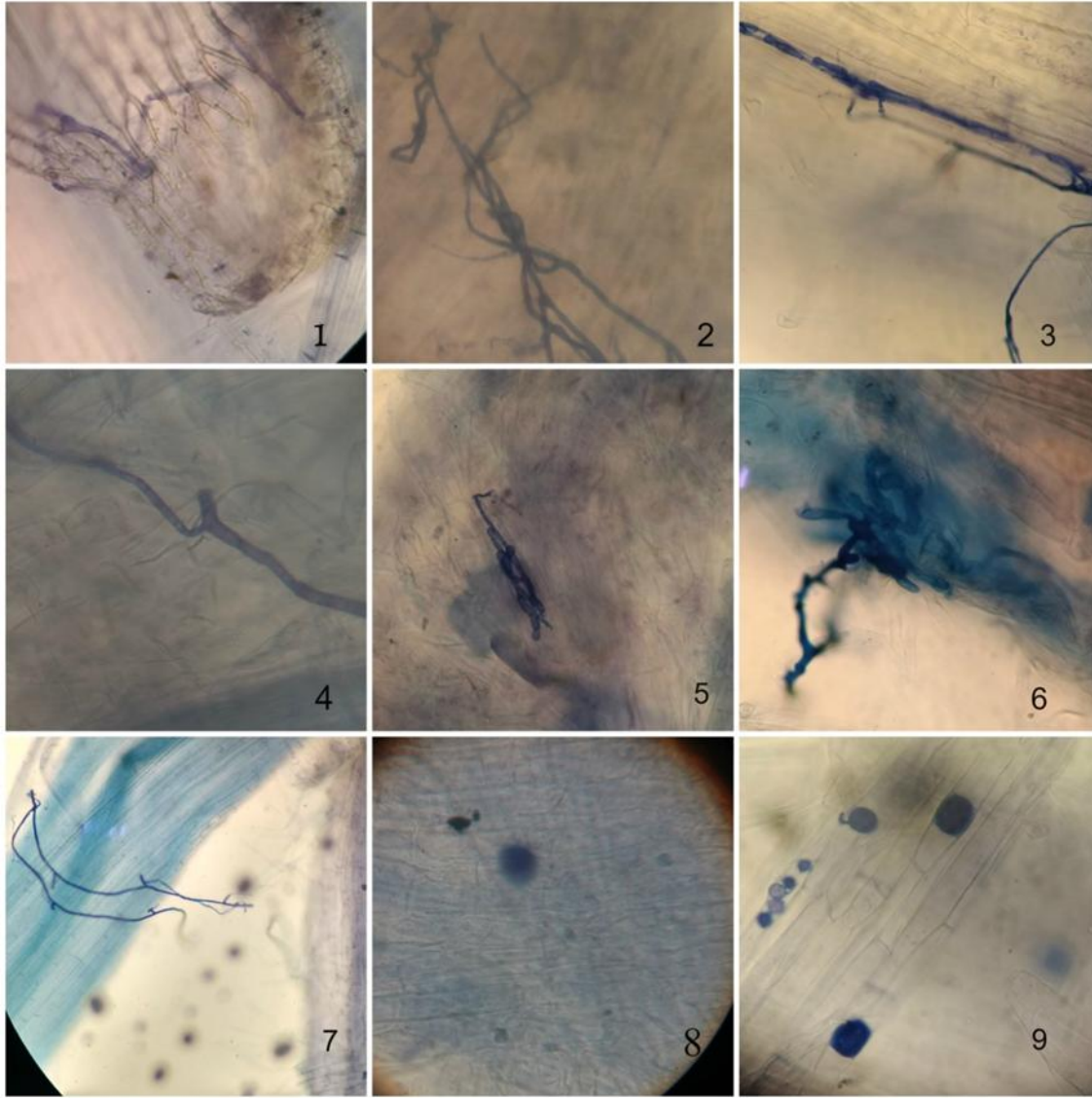


Figura 1: Vistas de las raíces micorrizadas de las plántulas tratadas con *Glomus intraradices* evaluadas a los 30 días después de la siembra observadas a 40X. Las fotografías 1, 2 y 3 pertenecen a la sección del cuello de la raíz, las fotografías 4, 5 y 6 pertenecen a la parte media de la raíz y las fotografías 7,8 y 9 al ápice de la raíz.

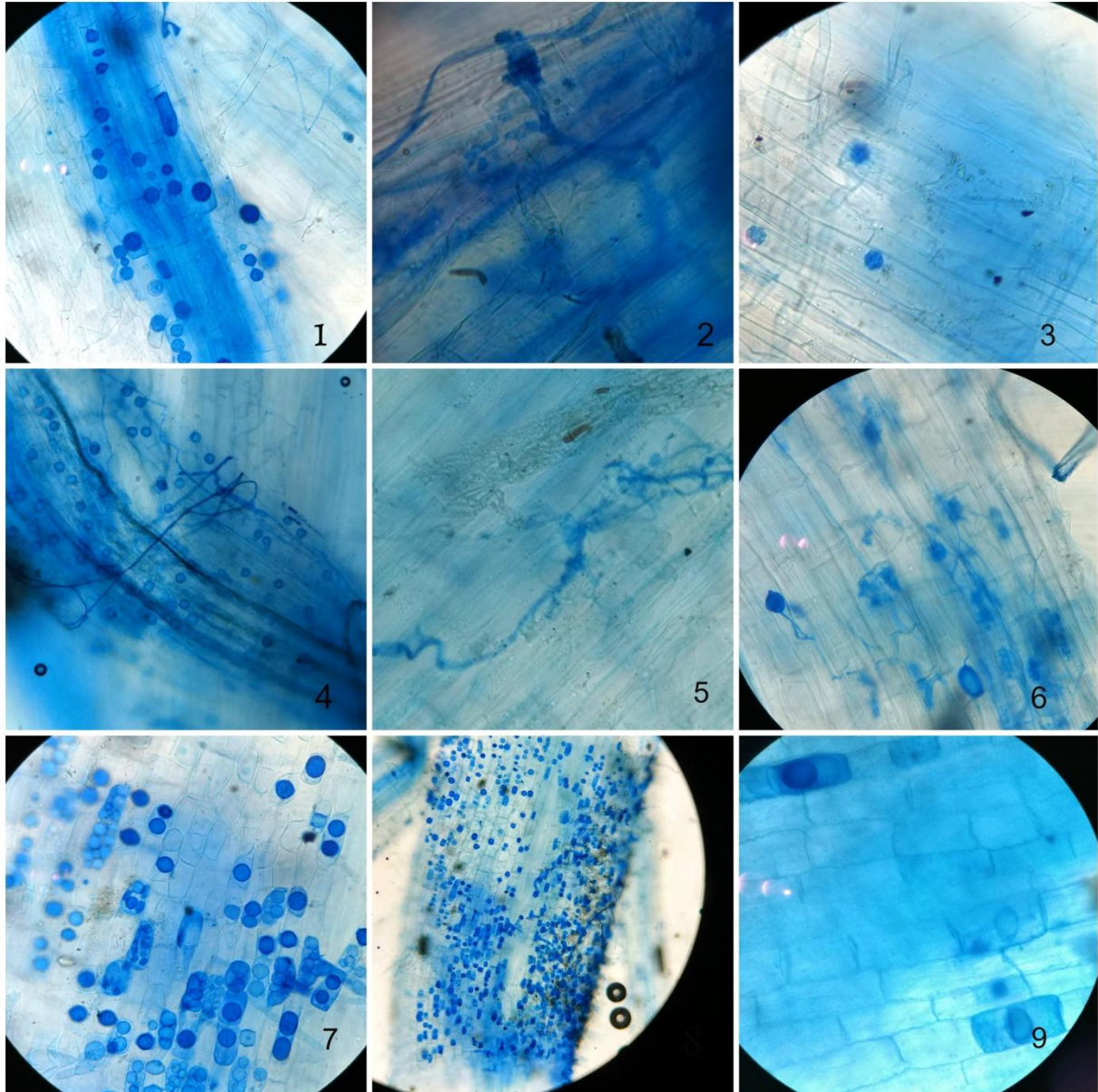


Figura 2: Vistas de las raíces micorrizadas de las plántulas tratadas con *Glomus intraradices* evaluadas a los 45 días después de la siembra observadas a 40X. Las fotografías 1, 2 y 3 pertenecen a la sección del cuello de la raíz, las fotografías 4, 5 y 6 pertenecen a la parte media de la raíz y las fotografías 7,8 y 9 al ápice de la raíz.

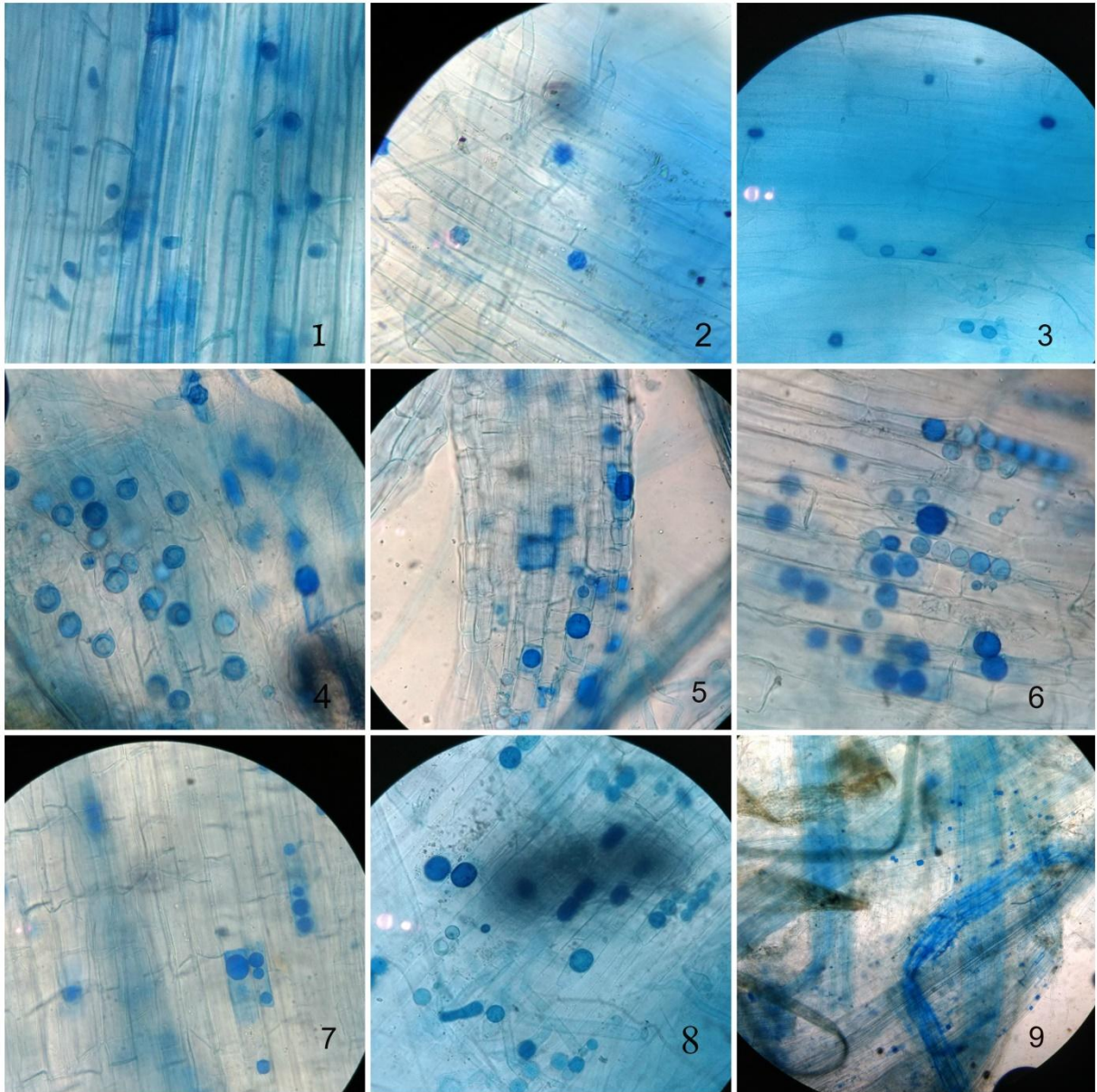


Figura 3: Vistas de las raíces micorrizadas de las plántulas tratadas con *Azospirillum brasilense* + *Glomus intraradices* evaluadas a los 45 días después de la siembra observadas a 40X. Las fotografías 1, 2 y 3 pertenecen a la sección del cuello de la raíz, las fotografías 4, 5 y 6 pertenecen a la parte media de la raíz y las fotografías 7,8 y 9 al ápice de la raíz.

## Fase de promoción del crecimiento

### Altura de la planta

El efecto que los microorganismos tuvieron sobre la altura de las plantas fue positivo en comparación con las plantas que no recibieron tratamiento alguno (Cuadro 4). El tratamiento que al finalizar el experimento estimulo mayor altura en las plantas fue la combinación de *Azospirillum brasilense* + *Glomus intraradices*, logando plantas con alturas medias de 133 cm. Los siguientes tratamientos de los que se obtuvieron plantas con alturas mayores al testigo fueron *Azospirillum brasilense* y *Glomus intraradices*. A pesar de que hubo diferencia en las alturas de las plantas de cada tratamiento, estadísticamente no se observó diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).

Cuadro 4. Comparación de medias de la variable altura de plántulas de maíz a distintas edades tratadas con dos tipos de biofertilizantes

Tratamiento	Altura cm				
	26 DDE	40 DDE	60 DDE	73 DDE	87 DDE
<i>Azospirillum brasilense</i>	33 a	47 a	87 ab	110 a	124 a
<i>Glomus intraradices</i>	37 a	54 a	88 ab	113 a	124 a
Azos+Glo	47 a	56 a	94 a	122 a	133 a
Testigo comercial	47 a	48 a	90 a	104 a	124 a
Testigo	35 a	55 a	79 b	97 a	121 a

DDE= Días después de la emergencia de la planta, Azos= *Azospirillum brasilense*, Glo= *Glomus intraradices*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ )

Este efecto es distinto al descrito por Pérez-Luna *et al* (2011) quienes al aplicar estos microorganismos de manera separada y en combinación, registraron que la combinación de los dos microorganismos generó plantas con alturas inferiores a las tratadas con *Azospirillum* solamente, diferencia que posiblemente fue causada

por las características del sustrato y el ambiente las cuales influyen en la cantidad de microorganismos, en el metabolismo de estos y en las relaciones que establecen con las plantas (Paul y Clark, 1996).

En otra investigación realizada por Villa-Castro *et al* (2014) con la aplicación de cepas de *Azospirillum brasilense* obtuvieron plantas de alturas superiores a las del testigo. Por otro lado González *et al* (2011) reportaron que utilizando *Azospirillum brasilense* como fuente de nitrógeno se logró una altura de 3.05 m en plantas de maíz, sin embargo esta no resulto ser diferente significativamente comparada con las alturas registradas en los tratamientos en los que no aplicaron la bacteria.

#### Número de hojas

En general el número de hojas no se vio influenciado por ningún tratamiento. En todas las fechas de muestreo la cantidad de hojas desarrolladas concordaron con la etapa de desarrollo en la que se encontraba la planta y la variación en el número de hojas en las últimas fechas de muestreo fue por la pérdida de hojas viejas (Cuadro 5).

Cuadro 5. Comparación de medias de la variable número de hojas de plántulas de maíz a distintas edades tratadas con dos tipos de biofertilizantes

Tratamiento	Número de hojas				
	26 DDE	40 DDE	60 DDE	73 DDE	87 DDE
<i>Azospirillum brasilense</i>	4 a	6 a	7 a	7 a	7 a
<i>Glomus intraradices</i>	4 a	6 a	8 a	7 a	7 a
Azos+Glo	4 a	6 a	8 a	8 a	7 a
Testigo comercial	4 a	6 a	7 a	7 a	7 a
Testigo	5 a	6 a	7 a	6 a	7 a

DDE= Días después de la emergencia de la planta, Azos= *Azospirillum brasilense*, Glo= *Glomus intraradices*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ )

En una investigación realizada por Aguilar *et al* (2015) se reportaron resultados similares al de esta investigación para esta variable, pues el número de hojas registradas para las plantas con inoculación de *Azospirillum* es ligeramente mayor al de las plantas que no recibieron tratamiento alguno, pero no son diferentes estadísticamente.

Qudsia *et al* (2013) reportaron un efecto parecido a los descritos anteriormente, la inoculación de *Azospirillum* no influyo de manera significativa en el desarrollo de las hojas en comparación con las plantas no inoculadas. Sin embargo en la investigación realizada por Pérez-Luna *et al* (2011) si se registró una diferencia en el número de hojas de las plantas, obteniendo mayor cantidad de hojas en las que recibieron como tratamiento la aplicación de *Azospirillum brasilense*.

Algunos de los factores que pueden influir en la diferencia de resultados en esta variable son los mecanismos de la cepa para promover el crecimiento vegetal, la colonización radicular y factores de interacción como la competencia, los cuales pueden intervenir en la producción y transporte de hormonas vegetales que aumenten la producción de biomasa (Bashan *et al* 2007).

#### Área foliar

Los resultados de la variable área foliar mostraron que el uso de los microorganismos beneficio al incremento del área foliar de las plantas. Aunque en las primeras etapas de desarrollo este efecto no se observó, al finalizar el experimento los individuos con mayor área foliar fueron los que recibieron como



tratamiento la inoculación con *Azospirillum brasilense* seguidos por el tratamiento en el que se combinó *Azospirillum brasilense* + *Glomus intraradices* (Cuadro 6).

Cuadro 6. Comparación de medias de la variable área foliar de plántulas de maíz a distintas edades tratadas con dos tipos de biofertilizantes.

Tratamiento	Área foliar cm <sup>2</sup>				
	26 DDE	40 DDE	60 DDE	73 DDE	87 DDE
<i>Azospirillum brasilense</i>	104.6 a	167.2 a	696.3 a	817.5 a	1045.2 a
<i>Glomus intraradices</i>	117.9 a	221.9 a	695.6 a	856.2 a	987.0 a
Azos+Glo	124.8 a	222.0 a	689.6 a	960.9 a	1018.6 a
Testigo comercial	153.6 a	198.8 a	541.6 a	862.5 a	997.9 a
Testigo	124.0 a	232.6 a	536.3 a	694.1 a	909.5 a

DDE= Días después de la emergencia de la planta, Azos= *Azospirillum brasilense*, Glo= *Glomus intraradices*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ )

Este resultado es parecido al reportado por Uribe y Dzib (2006) quienes al utilizar una combinación de *Azospirillum* con micorrizas obtuvieron plantas con una media de área foliar de 400 cm<sup>2</sup> y estas fueron superiores a las plantas que no recibieron tratamiento e incluso superaron también a plantas tratadas con fertilización química, aunque el área foliar reportada por Uribe y Dzib es inferior al área de las plantas de esta investigación.

Por el contrario Robles y Barea (2004) observaron que la combinación de *Glomus* y *Azospirillum* fue la que proporciono plantas con menor área foliar comparadas con las plantas que no fueron inoculadas, de las cuales registró hasta el doble del área foliar. En otra investigación en la que se probó la capacidad de *Glomus* se obtuvo una media de área foliar de 915 cm<sup>2</sup> (Roveda y Polo, 2007), media que resulta muy parecida a la que se obtuvo en esta investigación para las plantas con ese tratamiento.

## Peso seco hojas

De acuerdo con los resultados, a pesar de no observar diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, el tratamiento del que se registró un peso seco de hojas mayor al finalizar el experimento fue el testigo comercial con 4.67 g, a este le siguió el tratamiento en el que se aplicó la combinación de *Azospirillum brasilense* + *Glomus intraradices* con una media de peso seco de hojas de 4.62 g. El tratamiento en cual se observó el menor peso seco de hojas fue *Glomus intraradices* (Cuadro 7).

Cuadro 7. Comparación de medias de la variable peso seco de hojas de plántulas de maíz a distintas edades tratadas con dos tipos de biofertilizantes.

Tratamiento	Peso seco g				
	26 DDE	40 DDE	60 DDE	73 DDE	87 DDE
<i>Azospirillum brasilense</i>	0.22 a	0.39 a	1.96 a	2.85 ab	4.49 a
<i>Glomus intraradices</i>	0.25 a	0.53 a	1.99 a	2.82 ab	3.87 a
Azos+Glo	0.27 a	0.49 a	2.17 a	3.28 a	4.62 a
Testigo comercial	0.32 a	0.44 a	1.49 a	2.81 ab	4.67 a
Testigo	0.26 a	0.52 a	1.55 a	2.27 b	4.21 a

DDE= Días después de la emergencia de la planta, Azos= *Azospirillum brasilense*, Glo= *Glomus intraradices*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ )

Villa-Castro *et al* (2014) registraron un resultado equiparable con el obtenido en esta investigación, pues observaron que algunas cepas de *Azospirillum* inducen mayor peso seco de hojas pero este peso es casi igual al del testigo, e incluso existen cepas que estimularon menos peso seco de hojas que el testigo. En cuanto a la baja respuesta de *Glomus intraradices* Roveda y Polo (2007) encontraron un efecto semejante al observado en esta investigación pues la aplicación de esta micorriza produjo bajo peso seco de hojas.

## Peso seco del tallo

Las plantas de las que se registró un mayor peso seco del tallo al finalizar el experimento fueron las inoculadas con la cepa de *Azospirillum brasilense* con una media de peso seco de tallo de 4.20 g. Este tratamiento presentó diferencias significativas con respecto al testigo comercial y absoluto en un 81.03% (Cuadro 8).

Cuadro 8. Comparación de medias de la variable peso seco de tallo de plántulas de maíz a distintas edades tratadas con dos tipos de biofertilizantes.

Tratamiento	Peso seco g				
	26 DDE	40 DDE	60 DDE	73 DDE	87 DDE
<i>Azospirillum brasilense</i>	0.15 a	0.24 a	1.16 a	2.5 a	4.20 a
<i>Glomus intraradices</i>	0.2 a	0.36 a	1.16 a	2.61 a	2.80 ab
Azos+Glo	0.39 a	0.33 a	1.58 a	3.02 a	3.42 ab
Testigo comercial	0.24 a	0.25 a	0.91 a	2.45 a	2.57 b
Testigo	0.27 a	0.36 a	0.96 a	2.17 a	2.32 b

DDE= Días después de la emergencia de la planta, Azos= *Azospirillum brasilense*, Glo= *Glomus intraradices*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Realizando una comparación con lo publicado por Qudisia *et al* (2013) el efecto que produce la inoculación de *Azospirillum* en el peso seco del tallo de las plantas es similar en ambos experimentos, pues él en su última evaluación, registraron mayor peso seco en las plantas con *Azospirillum* y este tuvo diferencia significativa con respecto al testigo. Por su parte Gholami *et al* (2009) quienes al evaluar el efecto de distintos microorganismos promotores del crecimiento vegetal en plantas de maíz, registraron que la bacteria que promovió el mayor peso seco del tallo fue la cepa de *Azospirillum brasilense*.

## Peso seco de la raíz

Los resultados de esta variable mostraron que las plantas inoculadas con *Azospirillum brasilense* produjeron una mayor biomasa radical en comparación con el resto de los tratamientos. La combinación de *Azospirillum brasilense* + *Glomus intraradices* fue otro de los tratamientos que indujo un mayor peso seco de raíces comparado con el tratamiento testigo, fue un 54.05% mayor (Cuadro 9).

Cuadro 9. Comparación de medias de la variable peso seco de raíz de plántulas de maíz a distintas edades tratadas con dos tipos de biofertilizantes.

Tratamiento	Peso seco g				
	26 DDE	40 DDE	60 DDE	73 DDE	87 DDE
<i>Azospirillum brasilense</i>	1.20 a	1.52 a	11.42 ab	9.76 ab	14.32 a
<i>Glomus intraradices</i>	1.53 a	2.82 a	10.86 ab	8.86 ab	12.05 a
Azos+Glo	1.63 a	2.58 a	13.16 a	11.16 a	13.48 a
Testigo comercial	1.45 a	2.05 a	9.58 ab	7.58 ab	11.80 a
Testigo	1.07 a	2.62 a	6.05 b	4.71 b	8.75 a

DDE= Días después de la emergencia de la planta, Azos= *Azospirillum brasilense*, Glo= *Glomus intraradices*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Este resultado es comparable con los resultados presentados por Qudisia *et al* (2013) y Villa-Castro *et al* (2014) quienes registraron que la aplicación de *Azospirillum* indujo pesos secos de las raíces mayores a los del testigo.

En cuestión de la combinación de *Azospirillum* y *Glomus* Pérez-Luna *et al* (2011), registraron resultados semejantes a los de esta investigación ya que al aplicar esta combinación de microorganismos el volumen de las raíces de las plantas fue inferior a las que solamente tenían *Azospirillum* pero superior a las plantas testigo.

Estos resultados reflejan algunos de los efectos positivos que las bacterias de este género producen en el sistema radicular de las plantas ya que tienen la capacidad

de incrementar el número de raíces laterales, el volumen radicular, el peso seco de la raíz, entre otros beneficios, sin embargo la sobrepoblación de la bacteria puede provocar inhibición del crecimiento de las raíces (Bashan *et al* , 2007). Un ejemplo del efecto negativo fue presentado por Rangel-Lucio *et al* (2011) quienes reportaron que la inoculación de *Azospirillum* disminuyo significativamente el volumen de la raíz hasta en un 45%.

## CONCLUSIONES

La capacidad de *Azospirillum brasilense* y *Glomus intraradices* para colonizar las raíces de las plántulas de maíz es positiva. Las poblaciones de ambos microorganismos se desarrollan mejor al estar en combinación y su distribución se concentra en las partes medias y en los ápices de las raíces, logando un crecimiento estable con el paso del tiempo.

El crecimiento y desarrollo de las plántulas de maíz se ve favorecido con la aplicación de *Azospirillum brasilense* y *Glomus intraradices*, aunque este efecto no se distingue en las primeras etapas de desarrollo. Existe una respuesta más positiva al combinar los microorganismos que al utilizarlos de manera separada.

## LITERATURA CITADA

- Acebo, Y., N. Rives, M. Heydrich y A. Hernández. 2007. Efecto promotor del crecimiento vegetal de cepas de *Azospirillum* sp. en el cultivo del arroz. *Cultivos tropicales*. 28(3):29-32.
- Aguilar, C.C., J.A. Escalante e I. Aguilar. 2015. Análisis de crecimiento y rendimiento de maíz en clima cálido en función del genotipo, biofertilizante y nitrógeno. *Terra Latinoamericana*. 33(1): 51-62
- Aguirre-Cadena, J.F., S. Reyna, M. Cautle y J.F. Aguirre-Medina. 2014. Sobrevivencia de *Azospirillum brasilense* después de aplicar herbicidas en *Triticum aestivum* L. Var. Altiplano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 5(8): 1549-1555
- Aguirre-Medina, J. 2006. Biofertilizantes microbianos: Experiencias agronómicas del programa nacional del INIFAP en México. Libro Técnico Núm 2. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Rosario Izapa, Tuxtla Chico, Chiapas, México. 201 pp
- Ali, A., T. Mehmood, R. Hussain, A. Bashir, S. Najam and A. Ahmad. 2014. Investigation of biofertilizers influence on vegetative growth, flower quality, bulb yield and nutrient uptake in gladiolus (*Gladiolus grandiflorus* L.). *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*. 4(1):94-99.
- Badri, D.V. and J.M. Vivanco. 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell and Environment*. 32(6): 666–681

- Bashan, L.E., G. Holguin, B. Glick y Y. Bashan. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. En: Microbiología Agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo. Eds. Ferrera-Cerrato, R., y Alarcón, A. Editorial Trillas. Ciudad de México. 568 pp
- Basja, N., L. Quagliotto, M.L. Yanes, P. Vaz, G. Azziz, L. De la Fuente, P. Bagnasco, D. Davyt, C. Pérez, F. Ducamp, N. Altier y A. Arias. 2005. Selección de *Pseudomonas* fluorescentes nativas para controlar enfermedades de implantación en praderas. Agrocienca. 9(1): 321-325.
- Bustamante, A. y W. Zambrano. 2015. Eficiencia de la multiplicación de hongos micorrizicos arbusculares (HMA) nativos en *Zea mays* L. en condiciones de invernadero, Mayo-Diciembre 2014. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque, Perú.
- Carcaño-Montiel, M., R. Ferrera-Cerrato, J. Pérez-Moreno, J. Molina-Galán y Y. Bashan. 2006. Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. Terra Latinoamericana. 24(4):493-502
- Cárdenas, D.M., M.F. Garrido, R.R. Bonilla y V.L. Baldani. 2010. Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar. Pastos y Forrajes. 33(3): 1-17
- Chagas, A.F., A.G. Oliveira, L.A. De Oliveira, G.R. dos Santos, L.F.B. Chagas, A.L. Lopes and J.L. Acosta. 2015. Production of indole-3-acetic acid by



- Bacillus* isolated from different soils. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 21 (2): 282–287.
- Chandel, S., E.J. Allan and S. Woodward. 2010. Biological Control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* on Tomato by *Brevibacillus brevis*. Journal of Phytopathology. 158(7): 470-478
- Chauhan, H., D.J. Bagyaraj, G. Selvakumar and S. Sundaram. 2015. Novel plant growth promoting rhizobacteria-prospects and potential. Applied Soil Ecology. 95:38–53
- Cordero, I., B. Ruiz-Díez, T. Coba, L. Balaguer, M.M. Lucas, A. Rincón and J.J. Pueyo. 2016. Rhizobial diversity, symbiotic effectiveness and structure of nodules of *Vachellia macracantha*. Soil Biology & Biochemistry. 96: 39-54.
- Dhanasekar, R. and R. Dhandapani. 2012. Effect of biofertilizers on the growth of *Helianthus annuus*. International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences. 2(4): 143-147
- Díaz, A., M. Alvarado, M. Cantú y I. Garza. 2005. Fertilización biológica y producción de maíz en la región semiárida del norte de Tamaulipas, México. Agricultura Técnica en México. 31(2): 153-163
- Díaz, V.P., R. Ferrera-Cerrato, J.J. Almaraz-Suárez, y G. Alcántar. 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. Terra. 19(4): 327-335
- Escobar, C., Y. Horna, C. Carreño y G. Mendoza. 2011. Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp. y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon*

- esculentum* Mill. "tomate" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*. 2 (1): 39-49.
- Flores, P.A., R.M. Egúsquiza, A. Patiño, T.L. Sánchez; M. Alcarraz, J. Claudio, C. Trigos y A. Evangelio. 2014. Selección evaluación de microorganismos nativos con potencial antagonista de *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora infestans* promotores del crecimiento de tuberculillos de papa (*Solanum tuberosum* L.) in vitro. *Theorema- UNMSM*. 1(1): 27-36
- Fogar, M.N., M.C. Iglesias y M.F. Cracogna. 2002. Potencial eficacia de la inoculación con endomicorrizas del género *Glomus* en maíz (*Zea mays*) y su impacto sobre la actividad biológica del suelo. *Boletín Micológico*. 17: 63-67
- FAO. 1996. Ecología y enseñanza rural: Nociones ambientales básicas para profesores rurales y extensionistas. Estudio FAO 131. Food and Agriculture Organization. Roma, Italia. 187 pp.
- Franklin, A.K., P.N. Sommers, C.E. Aslan, B.R. López, J.L. Bronstein, E. Bustamante, A. Búrquez, R.A. Medellín, B. Marazzi. 2016. Plant biotic interactions in the Sonoran Desert: current knowledge and future research perspectives. *International Journal of Plant Sciences*. 177(3):217-234
- García-Olivares, J.G., A. Mendoza-Herrera, N. Mayek-Pérez. 2012. Efecto de *Azospirillum brasilense* en el rendimiento del maíz en el Norte de Tamaulipas, México. *Universidad y Ciencia*. 28(1):79-84

- García, F., H. Muñoz, C. Carreño y G. Mendoza. 2010. Caracterización de cepas nativas de *Azospirillum* spp. y su efecto en el desarrollo de *Oryza sativa* L. “arroz” en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*. 1(2): 107–116
- García, R. y T. Bach; 2009. Efecto de la inoculación con *Pseudomonas* sobre el rendimiento de trigo. En: Proyecto Regional Desarrollo y Difusión de Tecnología Para la Producción Ecológica. Informe Técnico 2009 del Centro Regional Buenos Aires Norte. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina. 263 pp
- García-Olivares, J.G., V.R. Moreno-Medina, I.C. Rodríguez-Luna, A. Mendoza-Herrera y N. Mayek-Pérez. 2006. Biofertilización con *Azospirillum brasilense* en sorgo, en el norte de México. *Agricultura Técnica en México*. 32 (2): 135-141
- Geiser, D.M., T. Aoki, C.W. Bacon, S.E. Baker, M.K. Bhattacharyya, M.E. Brandt, D.W. Brown, L.W. Burgess, S. Chulze, J. Coleman, J.C. Correll, S.F. Covert, P.W. Crous, C.A. Cuomo, G.S. De Hoog, A. Di Pietro, W.H. Elmer, L. Epstein, R.J.N. Frandsen, S. Freeman, T. Gagkaeva, A.E. Glenn, T.R. Gordon, N.F. Gogory, K.E. Hammond-Kosack, L.E. Hanson, M.M. Jiménez-Gasco, S. Kang, H.C. Kistler, G.A. Kuldau, J.F. Leslie, A. Logieco, G. Lu, E. Lysøe; L.J. Ma, S.P. McCormick; Q. Migheli, A. Moretti, F. Munaut, K. O'Donnell, L. Pfenning, R.C. Ploetz, R.H. Proctor, S.A. Rehner, V.A.R.G. Robert, A.P. Rooney, B.B. Salleh, M.M. Scandiani, J. Scauflaire, D.P.G. Short, E. Steenkamp, H. Suga, B.A. Summerell, D.A. Sutton, U. Thrane, F. Trail, A.V. Diepeningen, H.D. VanEtten, A. Viljoen, C. Waalwijk, T.J. Ward,

- M.J. Wingfield, J.R. Xu, X.B. Yang, T. Yli-Mattila, and N. Zhang. 2013. One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a Scientifically Robust Way that preserves longstanding use. *Phytopathology*. 103(5):400-408.
- Gholami, A., S. Shahsavani and S. Nezarat. 2009. The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*. 3(1): 9-14
- González, H.A., D. Pérez, O. Franco, A. Balbuena, F. Gutiérrez y H. Romero. 2011. Respuesta de tres cultivares de maíz a la inoculación con *Azospirillum brasilense* bajo cuatro diferentes dosis de nitrógeno. *CIENCIA ergo sum*. 18(1): 51-58.
- Guigón-López, C. y P. González-González. 2004. Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp con actividad antagónica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*. 22(1): 117-124
- Haas, D. and G. Défago. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*. 3(4):307-319.
- Haiyambo, D.H., P.M. Chimwamuronbe and B. Reinhold-Hurek. 2015. Isolation and screening of rhizosphere bacteria from gasses in East Kavango Region of Namibia for plant growth promoting characteristics. *Current Microbiology*. 71(5):566-71

- Hammami, I., A. Ben, N. Hamdi, R. Gdoura and M. Ali. 2013. Isolation and characterization of rhizosphere bacteria for the biocontrol of the damping-off disease of tomatoes in Tunisia. *Comptes Rendus Biologies*. 336(11): 557-564
- Harman, G.E., C.R. Howell, A. Viterbo, I. Chet and M. Lorito. 2004. *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*. 2(1): 43-56
- Hend, A. and K. Perveen. 2012. Biological control of *Fusarium* wilt of tomato by antagonist fungi and cyanobacteria. *African Journal of Biotechnology*. 11(5):1100-1105
- Hernández, A., N. Rives, A. Caballero, A.N. Hernández y M. Heydrich. 2004. Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz en la producción de metabolitos del tipo AIA sideróforos y ácido salicílico. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 6 (1): 6-13.
- Hernández-Acosta E., M.C. Gutiérrez-Castorena, J.E. Rubiños-Panta, J. Alvarado-López. 2006. Caracterización del suelo y plantas de un sitio contaminado con hidrocarburos. *Terra Latinoamericana*. 24(4):463- 470
- Hugenholtz, P., B.M. Goebel and N.R. Pace. 1998. Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *Journal Of Bacteriology*. 180(18):4765-4774

- Jayamma, N., N.M. Naik and K. Jagadeesh. 2014. Influence of Biofertilizer Application on Growth, Yield and Quality Parameters of Jasmine (*Jasminum auriculatum*). International Conference on Food, Biological and Medical Sciences. 28- 29 January. Bangkok Thailand.
- Kamilova, F., L.V. Kravchenko, A.I. Shaposhnikov, T. Azaranova; N. Makarova and B. Lugtengberg. 2006. Organic acids, sugars, and l-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 19(3):250-256.
- Lakshmanan, V., G. Selvaraj and H. Bais. 2014. Functional soil microbiome: belowground solutions to an aboveground problem. *Plant Physiology*. 166(7): 689-700
- Lara, M.C., M. Villalba y L.E. Oviedo. 2007. Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 9(2): 6-14.
- López, S.N. 2013. Efecto de aislados de los géneros *Streptomyces* y *Bacillus* como promotores de crecimiento vegetal en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis de Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente. Instituto Politécnico Nacional. Guasave, Sinaloa, México. 99 pp
- Lugtenberg, B. and F. Kamilova. 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *The Annual Review of Microbiology*. 63(1):541-556.

- Lugtenberg, B.J. and G.V. Bloemberg. 2004. Life in the rhizosphere. In: Pseudomonas, Ed. JL Ramos. Kluwer Acad./Plenum. New York, USA. 633 pp.
- Luna, M.L., R.A. Martínez, M. Hernández, S.M. Arvizu y J.R. Pacheco. 2013. Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. Revista Fitotecnia Mexicana. 36(1):63-69
- Neyra, V.S., L. Terrones, L. Toro, B. Zárate y B. Soriano. 2013. Efecto de la inoculación de *Rhizobium etli* y *Trichoderma viride* sobre el crecimiento aéreo y radicular de *Capsicum annum* var. *Longum*. REBIOLEST Revista Científica de Estudiantes Facultad de Ciencias Biológicas. 1(1):12-21
- Norberto, M. 2011. Potencial de rizobacterias *Pseudomonas putida* como biofertilizantes para el crecimiento de plantas de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* L.). Trabajo de experiencia recepcional. Universidad Veracruzana, Xalapa de Enríquez, Veracruz. 42 pp
- Núñez, S.D.B., R.G. Liriano, J.L. Álvarez, Y.B. Walker y Y.A. Candelario. 2013. Resultados de la aplicación de biofertilizantes a base de *Azospirillum* y micorrizas en asociaciones de cultivos hortícolas en condiciones de semiprotegido. Centro Agrícola, 40(1): 23-28.
- Obando, M., D. Rivera y R. Bonilla. 2013. Respuesta fisiológica a la fertilización por *Azotobacter chroococcum* ac1 y fertilización nitrogenada de síntesis sobre el maíz (*Zea mays* L.) en invernadero. BioTecnología. 17(1): 11-22.

- Panchal, R.V., N.S. Parekh, A. Parmar and H. Patel. 2010. Effect of biofertilizers and nitrogenous fertilizer on growth, flowering and yield of annual white chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium* L.) under middle Gujarat agroclimatic conditions. *The Asian Journal of Horticulture*. 5(1): 22-25
- Paul, E.A., and F.E. Clark. 1996. *Soil Microbiology and Biochemistry*. Second edition. Academic Press Inc. San Diego, California. USA. 273 pp
- Pérez-Luna, Y.C., J.D. Álvarez-Solís, J. Mendoza-Vega, J.M. Pat-Fernández, R. Gómez-Álvarez Y L. Cuevas. 2012. Diversidad de hongos micorrícicos arbusculares en maíz con cultivo de cobertura y biofertilizantes en Chiapas, México. *Gayana Botánica*. 69(1): 46-56.
- Pérez-Luna, Y.C., J.D. Álvarez-Solís, J. Mendoza-Vega, J.M. Pat-Fernández y R. Gómez-Álvarez. 2011. Influencia del humus de lombriz y biofertilizantes en el crecimiento y rendimiento de maíz. *Gayana Botánica*. 68(1): 15-22
- Pinton, R., Z. Varanini and P. Nannipieri. 2007. *The rhizosphere: Biochemistry and organic substances at Soil-Plant interface*. Second edition. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. 472 pp
- Postma, A., E. Slabbert, F. Postma and K. Jacobs. 2016. Soil bacterial communities associated with natural and commercial *Cyclopia* spp. *FEMS Microbiology Ecology*. 92(3)1-10
- Qudsia, B., I. Noshin, B. Asghari, N. Zafar, A. Akram and F. Hassan. 2013. Effect of *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays* L.) under drought stress. *Pakistan Journal of Botany*. 45(1):13-20



- Quiroz-Sarmiento, V.F., R. Ferrera-Cerrato, A. Alarcón, M.E. Lara. 2008. Antagonismo *in vitro* de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan el cultivo del ajo. *Revista Mexicana de Micología*. 26: 27-34.
- Rangel-Lucio, J.A., M. Rodríguez-Mendoza, R. Ferrera-Cerrato, J. Castellanos-Ramos, R. Ramírez-Gama y E. Alvarado-Bárceñas. 2011. Afinidad y efecto de *Azospirillum* sp en maíz. *Agronomía Mesoamericana*. 22(2): 269-279
- Reyes, I., L. Álvarez, H. El-Ayoubi y A. Valery. 2008. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro* 20(1): 37-48.
- Reyes, I. y A. Valery. 2007. Efecto de la fertilidad del suelo sobre la microbiota y la promoción del crecimiento del maíz (*Zea mays* L.) con *Azotobacter* spp. *Bioagro*. 19(3):117-126.
- Rives, N., Y. Acebo, M. Almaguer, J.C. García y A. Hernández. 2009. Actividad antagónica frente a *Pyricularia grisea* (Sacc.) y fitoestimulación en el cultivo del arroz de cepas autóctonas de *Pseudomonas putida* (Trev.). *Revista de Protección Vegetal*. 24(2): 106-116.
- Robles, C. y J. Barea. 2004. Respuesta de la planta y del suelo a inoculación con *Glomus intraradices* y rizobacterias en maíz en cultivo intensivo. *Terra Latinoamericana*. 22(1): 59-69.

- Rout, M.E. and D. Southworth. 2013. The root microbiome influences scales from molecules to ecosystems: the unseen majority. *American Journal of Botany* 100(9): 1689–1691
- Roveda, G. y C. Polo. 2007. Mecanismos de adaptación de maíz asociado a *Glomus* spp en suelos con bajo fósforo disponible. *Agronomía Colombiana*. 25(2):349-356
- Sánchez- Yáñez, J.M., I.Y. López, J. Villegas y N.M. Moreno. 2014. Respuesta del maíz (*Zea mays* L) a la inoculación con *Azotobacter* sp y *Burkholderia* sp a dosis reducida de fertilizante nitrogenado. *Scientia Agropecuaria*. 5(1): 17-23.
- Santillana, N., C. Arellano y D. Zuñiga. 2005. Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). *Ecología Aplicada*. 4(1): 47-51
- Sepúlveda, M. 2013. Aislamiento, selección y evaluación de bacterias promotoras de crecimiento (PGPR) en lechuga (*Lactuca sativa* L.) var. *capitata* 'desert storm'. Tesis de Licenciatura. Universidad de Concepción. Chillán, Chile.
- Serralde, A. y M. Ramírez. 2004. Análisis de poblaciones de micorrizas en maíz (*Zea mays*) cultivado en suelos ácidos bajo diferentes tratamientos agronómicos. *Revista Corpoica*. 5(1): 31-40
- Soroa-Bell, M.R., A. Henández-Fernández, F. Soto-Carreño y E. Terry-Alfonso. 2009. Identificación de algunas especies de microorganismos benéficos en

- la rizósfera de gerbera y su efecto en la productividad. Revista Chapingo Serie Horticultura.15 (2): 41-48
- Tejera, B., M. Heydrich y M. Rojas. 2012. Antagonismo de *Bacillus* spp frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Revista de Protección Vegetal 27(2): 117-122
- Turkington, A., J. Phillips and S. Campbell. 2004. Weathering and Landscape Evolution. Proceedings of the 35th Binghamton Symposium in Geomorphology. 1-3 October. Kentucky. USA. 272 pp
- Tzfira, T. and V. Citovsky. 2007. Agrobacterium: From Biology to Biotechnology. Springer Science & Business Media. New York. USA. 750 pp
- Uribe, G. y R., Dzib. 2006. Micorriza arbuscular (*Glomus intraradices*), *Azospirillum brasilense* y brassinoesteroide en la producción de maíz en suelo luvisol. Agricultura Técnica en México. 32(1): 67-76
- Van Loon, L. 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. European Journal of Plant Pathology. 119(3): 243-254.
- Vázquez, M.M, S. César, R. Azcón and J.M. Barea. 2000. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. Applied Soil Ecology. 15(3): 261–272

- Villa-Castro, L., N. Mayek-Pérez, J.G. García-Olivares y J.L. Hernández-Mendoza. 2014. Efecto de la inoculación en maíz con cepas nativas de *Azospirillum* sp. *Avances de Investigación Agropecuaria*. 18(1): 33-38
- Vital, L.L., M.A. Hernández, S. Fernández y A. Mendoza. 2015. Diversidad bacteriana en raíces de maíz híbrido convencional y genéticamente modificado. *PYTON Revista Internacional de Botánica Experimental*. 84(1):233-243
- Wu, B., X. Wang, L. Yang, H. Yang, H. Zeng, Y. Qiu, C. Wang, J. Yu, J. Li, D. Xu, Z. He and S. Chen. 2016. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* ZM9 on bacterial wilt and rhizosphere microbial communities of tobacco. *Applied Soil Ecology* 103: 1–12