

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA



Bacillus subtilis y su relación en el crecimiento de papa (*Solanum tuberosum*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), calabacita (*Cucurbita pepo*) y maíz (*Zea mays*).

Por:

EDILBERTO QUINTERO CASTAÑEDA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Buenavista, Saltillo, Coahuila; México.

Marzo de 2006.

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

Bacillus subtilis y su relación en el crecimiento de papa (*Solanum tuberosum*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), calabacita (*Cucurbita pepo*) y maíz (*Zea mays*).

TESIS

Presentada por:

EDILBERTO QUINTERO CASTAÑEDA

Que Somete a Consideración del H. Jurado Examinador como Requisito Parcial para
Obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITOLOGO

Aprobada por:

Dr. Alberto Flores Olivas
(Presidente del jurado)

M.C. Abiel Sánchez Arizpe
(Asesor)

Dr. Víctor Zamora Villa
(Asesor)

M.C. Catalina Chávez Betancourt
(Asesor suplente)

M.C. Arnoldo Oyervides García
(Coordinador de la División de Agronomía).

DEDICATORIA

Primeramente a dios, por permitirme la vida.

A mis padres:

Sr. José Quintero Salas

Sra. Elpidia Castañeda Estrada

A los que con desvelos, sacrificios y carencias nunca dejaron de apoyarme, moral y económicamente para poder ser lo que ahora soy. A ellos que sin condición alguna depositaron en mí toda su confianza y hoy les demuestro que fui digno de ella para poder ser un hombre de bien.

A mis hermanos, de quienes he recibido apoyo y consejos sin condición alguna y en todo momento; especialmente a Ma. Del Carmen quien una de sus grandes ilusiones fue verme formado como profesionista.

A mi sobrina Daniela, por haberse convertido en la luz de la familia.

A mi novia, por compartir su tiempo conmigo, además de brindarme cariño y comprensión en mis momentos difíciles. Quien por éstos y muchos detalles más se ha ganado mi cariño y respeto.

A mis paisanos y compañeros de cuarto, por todas las experiencias que vivimos juntos durante mi estancia en esta Universidad.

A mis compañeros y amigos de la generación C de la UAAAN de Parasitología Agrícola, por haber sido un grupo ejemplar.

A la familia Barrios Yen, por haberme apoyado sin condición alguna en los momentos que más lo necesité.

AGRADECIMIENTOS

A mi ALMA MATER, por haberme permitido formarme como profesionalista dentro de sus instalaciones. Sus colores los llevo en el corazón y los defenderé a dondequiera que vaya.

Al departamento de Parasitología, por haberme facilitado los medios para poder especializarme dentro de esta área.

A mis asesores, por haber dedicado parte de su tiempo a la realización de este trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	V
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	VII
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVO.....	2
HIPÓTESIS.....	2
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Bacterias PGPR.....	3
Características de las PGPR.....	3
Mecanismos de acción de las PGPR.....	3
Promoción indirecta del crecimiento de plantas.....	4
Promoción directa del crecimiento de plantas.....	4
Colonización de las PGPR.....	5
Reguladores de crecimiento producidos por las PGPR.....	5
Producción de auxinas por PGPR y su efecto en el desarrollo radicular.....	6
Modulación de los niveles de etileno en plantas por PGPR.....	6
El género <i>Bacillus</i> como rizobacteria promotora del crecimiento de las plantas.....	7
Características del género <i>Bacillus</i>	7
<i>Bacillus subtilis</i> como promotora de crecimiento.....	8
Características de <i>Bacillus subtilis</i>	8
Taxonomía de <i>Bacillus subtilis</i>	8
Importancia del uso de bacterias promotoras de crecimiento.....	9
MATERIALES Y METODOS.....	10
Ubicación del experimento.....	10
Obtención de la cepa (LPM ₁) de <i>Bacillus subtilis</i>	10
Incremento de <i>Bacillus subtilis</i>	10
Conteo de <i>Bacillus subtilis</i>	10

Esterilización del sustrato y <i>B. subtilis</i>	11
Diseño del experimento.....	11
Tratamientos.....	11
Preparación de las macetas y las diferentes concentraciones de <i>B. subtilis</i>	12
Siembra de las semillas e inoculación de <i>B. subtilis</i>	12
Evaluación de los parámetros.....	13
Análisis estadístico.....	14
RESULTADOS Y DISCUSION.....	15
Longitud de tallo.....	15
Longitud de raíz.....	16
Longitud de planta completa.....	16
Peso fresco de tallo.....	17
Peso fresco de raíz.....	18
Peso fresco de planta completa.....	19
Peso seco de raíz.....	20
Peso seco de tallo.....	20
Peso seco de planta completa.....	21
CONCLUSIONES.....	23
LITERATURA CITADA.....	24
APENDICE.....	27

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica no.1.- Comparación entre cultivos de los resultados obtenidos en el parámetro longitud de tallo (LT).....	15
Gráfica no. 2.- Comparación entre cultivos de los resultados obtenidos en el parámetro longitud de raíz (LR).....	16
Gráfica no.3.- Comparación entre cultivos de los resultados obtenidos en el parámetro longitud de planta completa (LPC).....	17
Gráfica no. 4.- Comparación entre cultivos de los resultados obtenidos en el parámetro peso fresco de tallo (PFT).....	18
Gráfica no. 5.- Comparación entre cultivos de los resultados obtenidos en el parámetro peso fresco de raíz (PFR).....	19
Gráfica no. 6.- Comparación entre cultivos de los resultados obtenidos en el parámetro Peso fresco de planta completa (PFPC).....	19
Gráfica no. 7.-Comparación entre cultivos de los resultados obtenidos en el parámetro Peso seco de raíz (PSR).....	20
Gráfica no. 8.-Comparación entre cultivos de los resultados obtenidos en el parámetro peso seco de tallo (PST).....	21
Gráfica no. 9.- Comparación entre cultivos de los resultados obtenidos en el parámetro peso seco de planta completa (SPC).....	21

INTRODUCCIÓN

Las causas más comunes en la baja producción agrícola son el crecimiento deficiente de plantas y la destrucción de cosechas por factores bióticos y abióticos. La FAO (2000) (Dato mencionado por Jiménez 2004), reconoce que la biotecnología agrícola puede contribuir a elevar la producción en este sector a través de alimentos que incrementen su valor nutricional, que reduzcan la utilización de productos químicos y/o aumenten la producción de cultivos de interés agrícola, Por lo que su importancia se hace mayor a medida que las fuentes tradicionales de abastecimiento se van agotando o limitando. Dentro de las técnicas de las técnicas de la agro-biotecnología, se incluye el uso de inoculantes biológicos, la cual considera la selección y multiplicación de los microorganismos benéficos para el desarrollo de las plantas, tanto aquellos que protegen a la misma contra el ataque de patógenos, plagas y malezas, como aquellos que proporcionan nutrimentos.

El suelo representa un hábitat heterogéneo, en el cual las condiciones pueden variar de un microhábitat a otro. Dichas diferencias corresponden a un gran número de nichos. Así, la región del suelo en contacto con la raíz, es decir, la rizósfera, es un hábitat rico en nutrimentos, de tal manera que el 40% de los fotosintatos movidos en la raíz son perdidos en el suelo en forma de mucílago, células muertas, material de la pared celular y solutos orgánicos, que incluyen azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos y compuestos fenólicos (Lazarovits y Nowak, 1997). Todo esto, implica procesos asociados con la competencia en la rizósfera, en donde los microorganismos que ahí residen interactúan entre si y con las raíces de las plantas por vías que afectan su crecimiento y desarrollo. Estos procesos pueden ser considerados como neutros, dañinos o benéficos para el crecimiento de las plantas (Beauchamp y col., 1991).

En la rizósfera existe un grupo particular de bacterias con efectos benéficos en la planta que pueden representar un potencial como agentes biofertilizantes cuando son aplicados a cultivos de importancia agrícola (Bloemberg y Lugternberg (2001), mencionados por Jiménez, 2004). Estas bacterias son referidas como rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas o bacterias PGPR.

Tomando en cuenta estas ventajas, se buscó que el presente trabajo fuera representativo; es decir, que los cultivos utilizados en él fueran de diferentes familias botánicas para ver cual

era la respuesta para cada uno de ellos. De igual forma se utilizaron cultivos de mucha importancia como es el caso de la papa, que es uno de los cultivos con una amplia gama de plagas y enfermedades, y por lo tanto, el uso de productos químicos es mayor. Sin embargo, no son menos importantes el frijol, maíz y calabacita, que si bien no tienen los mismos requerimientos que la papa, de cualquier forma son cultivos básicos ampliamente cultivados y que también cuentan con un amplio espectro de plagas y enfermedades, y como consecuencia también exigen el uso de productos químicos.

En base a lo anterior, para el presente trabajo se planteó el siguiente:

OBJETIVO

Evaluar el efecto de *Bacillus subtilis* como promotor de crecimiento radicular en los cultivos de papa (*Solanum tuberosum*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), calabacita (*Cucurbita pepo*) y maíz (*Zea mays*), aplicada como tratamiento a la semilla bajo condiciones de invernadero.

HIPÓTESIS

La cepa LPM₁ de *Bacillus subtilis* promueve el crecimiento vegetativo de los cultivos de papa (*Solanum tuberosum*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), calabacita (*Cucurbita pepo*) y maíz (*Zea mays*).

REVISIÓN DE LITERATURA

Bacterias PGPR

Kloepper *et al.* (1989), definió en 1978 a un tipo de bacteria como PGPR (por sus siglas en inglés, que significan plant growth promoting rhizobacteria, o rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal), las que demostraron ser organismos altamente eficientes para aumentar el crecimiento de las plantas e incrementar su tolerancia a otros microorganismos causantes de enfermedades.

Características de las PGPR.

De manera general, las características de las PGPR son las siguientes:

- a) No requieren la invasión interna de tejidos de plantas ni de la formación de estructuras especializadas.
- b) Un segundo criterio para considerar a una rizobacteria como PGPR, es que ésta tenga la capacidad de persistir en el suelo después de la inoculación, ya que una población que disminuye rápidamente en la rizósfera tiene una baja capacidad competitiva con la microflora nativa del suelo.
- c) La característica más importante es que este tipo de bacterias presentan una capacidad de colonización efectiva en la superficie de la raíz para tener un efecto significativo sobre el crecimiento de la planta (Smith y Goodman, 1999).

Mecanismos de acción de las PGPR

Conceptualmente y de acuerdo a Kloepper (1989), las bacterias promotoras de crecimiento pueden tener un impacto favorable sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas por dos vías diferentes: indirectas y directas (Bloemberg y Lugternberg, 2001)

Promoción indirecta del crecimiento de las plantas.

La promoción indirecta del crecimiento de las plantas ocurre cuando las PGPR previenen, disminuyen o eliminan el efecto deletéreo de uno o más organismos fitopatógenos a través de diferentes mecanismos que involucran aspectos de control biológico:

- a) Secreción de sideróforos
- b) Síntesis de antibióticos
- c) Capacidad de algunas cepas, especialmente del género *Pseudomonas* para sintetizar cianidina.
- d) Ha sido demostrado que diferentes grupos de microorganismos son capaces de hidrolizar el ácido fusárico, factor responsable del daño en plantas que ocurre en la infección por *Fusarium*.
- e) Síntesis de enzimas que hidrolizan las paredes celulares de hongos fitopatógenos, tales como quitinasas y β -1.3-glucanasas.
- f) Competencia por nutrientes.
- g) Las PGPR activan mecanismos de defensa en plantas que son fenotípicamente similares a la inducción de resistencia mediada por patógenos referida como inducción de resistencia sistémica (Van Loon y col., 1998).

Promoción directa del crecimiento de plantas.

La promoción directa del crecimiento de plantas, ocurre cuando las PGPR proveen a la planta de compuestos que son sintetizados por las bacterias o bien facilitan la disponibilidad de nutrientes presentes en el suelo a través de diferentes mecanismos:

- a) Fijación de nitrógeno
- b) Incremento en la disponibilidad de minerales, principalmente fósforo

- c) Síntesis de compuestos reguladores del crecimiento; ácido indolacético (AIA), giberelinas y citocininas.
- d) Síntesis de compuestos de bajo peso molecular menos caracterizados que modulan el crecimiento y desarrollo de las plantas, por ejemplo, compuestos volátiles.
- e) Ha sido sugerido que la secreción de ácido succínico y láctico por cepas del género *Pseudomonas* pueden actuar directamente estimulando el crecimiento de plántulas de espárrago.
- f) Regulación de los niveles de etileno por acción de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (Shah y col., 1998).

Colonización de las PGPR.

Enfocando la atención en los microorganismos directos de estimulación del crecimiento de plantas, se asume que como prerrequisito es necesaria la adhesión de la bacteria a la semilla o a la raíz de la planta, mostrando la capacidad de las diferentes cepas de PGPR para colonizar la superficie de la raíz y la rizósfera. Por ejemplo, estudios de microscopía electrónica de raíces de plántula de canola, creciendo bajo condiciones axénicas en presencia de la cepa *Pseudomonas putida* GR12-2, indican que la adherencia de la bacteria a la superficie de la semilla fue suficiente para aumentar la elongación de la raíz durante los primeros días de desarrollo de plántulas (Hong *et al.*, 1991). De igual modo, el estudio realizado por Persello-Cartienaux *et al.* (2001), indican que la colonización de la rizósfera de *Arabidopsis thaliana* por cepas de *Pseudomonas* tienen la capacidad de inducir cambios morfológicos en la raíz promoviendo de esta manera su desarrollo. Sin embargo, el proceso de colonización puede variar notablemente debido a factores que modifican la interacción planta-PGPR. De modo que, la estructura del suelo, el contenido de humedad, aireación, pH, genotipo de la planta, actividades y composición de la microflora nativa del suelo pueden influir y afectar en magnitud y dirección la respuesta del crecimiento de la planta posterior a la inoculación de cepas PGPR (Buyer *et al.*, 1999).

Reguladores de crecimiento producidos por las PGPR.

La evaluación del efecto promotor por acción de cepas PGPR, es medido en la mayoría de los casos por un incremento en la magnitud de diferentes parámetros biométricos, por ejemplo: peso seco de follaje, raíz y fruto, área foliar, número de hojas, altura de la planta, entre otros, observando una rápida germinación de la semilla, mejor emergencia de la plántula, aceleramiento en su desarrollo e incremento en el rendimiento del cultivo.

El mecanismo que ha sido con mayor frecuencia involucrado para explicar los efectos de las PGPR antes mencionados, es la producción de las fitohormonas, enfocando la atención en la capacidad de diferentes cepas de PGPR para modular los niveles de etileno en plantas y de producir auxinas, funcionando como reguladores de crecimiento y desarrollo de las plantas (Cattelan y col., 1998).

Producción de auxinas por PGPR y su efecto en el desarrollo del sistema radicular.

Las auxinas promueven la diferenciación de tejido vascular, división y elongación celular, elongación de tallos y raíz e iniciación de raíces adventicias y laterales. En plantas, la auxina más abundante es el ácido indolacético (AIA), este compuesto principalmente se sintetiza a partir del triptofano en el meristemo apical y en hojas jóvenes de donde se transporta a través del floema al resto de los tejidos vegetales. La concentración de auxinas es crítica para la respuesta fisiológica, además de los factores que influyen en los niveles endógenos de auxinas, degradación, hidrólisis y formación de conjugados; las auxinas secretadas por cepas PGPR pueden funcionar como fuente exógena para la planta. Es reconocido que cepas de PGPR, como las del género *Bacillus* sintetizan AIA y su efecto en plantas mimetiza los efectos de AIA exógeno. Por otra parte, como se mencionó con anterioridad, la promoción del crecimiento de la raíz es uno de los principales marcadores por el cual el efecto benéfico de las PGPR es medido. Estos reportes nos indican que la producción de AIA por bacterias PGPR en la rizósfera es importante para determinar el

efecto de éstas sobre la morfología de la raíz, asociado a la especie de la planta y al estado de desarrollo del sistema radicular (Yang y Hoffman, 1984).

Modulación de los niveles de etileno en plantas por PGPR y su efecto en el desarrollo del sistema radicular.

El etileno ($\text{CH}_2=\text{CH}_2$) es un gas importante que actúa como regulador del crecimiento vegetal, así como para responder a condiciones de estrés. Se le ha asociado a procesos tan diversos como la maduración del fruto, senescencia, abscisión, germinación, elongación y desarrollo celular, nodulación, y respuesta al ataque de patógenos (Kende y Zeevaart, 1997).

En plantas superiores el etileno se produce a partir de la L-metionina e involucra la formación de dos intermediarios, la S-adenosil-L-metionina (SAM) y el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC). Las enzimas involucradas en esta secuencia metabólica son la SAM sintetasa, la cual cataliza la conversión de metionina a SAM y la ACC sintasa, la cual es responsable de la hidrólisis de SAM a ACC y 5'-metiltioadenosina (MTA), finalmente la ACC oxidasa, metaboliza el ACC a etileno, CO_2 y HCN (Yang y Hoffman, 1984).

El género *Bacillus* como rizobacteria promotora del crecimiento de plantas.

Gran número de bacterias de vida libre pueden ser consideradas como cepas PGPR; ha sido reportado que especies de los géneros *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, entre otros, promueven el crecimiento de plantas en diferentes cultivos.

Dentro de este grupo, el género *Bacillus* es de gran interés y ha sido objeto de estudio en la promoción del crecimiento de plantas por varios años debido a las ventajas que éste ofrece sobre otros géneros bacterianos (Glick, 1995).

Características del género *Bacillus*

Los bacilos en general están clasificados dentro de los microorganismos aeróbicos o facultativos y productores de catalasa. Tienen un ADN (mol% G+C) de 32 -8. Pueden ser Gram positivos o Gram variables, en general producen endosporas o sea esporas que se forman dentro de la célula.

Las características generales del género *Bacillus* son:

- Producen endosporas, las que son termorresistentes y también resisten a agentes perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos.
- Muchos bacilos producen enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuentes de carbono y donadores de electrones. · muchos bacilos producen antibióticos y son ejemplos de estos la bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina y circulina.
- Los bacilos en general crecen bien en medios sintéticos que contienen azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes, etc. como las únicas fuentes de carbono y el amonio como única fuente de nitrógeno.
- Viven dentro los límites de temperatura de 55 a 70°C · el límite inferior de pH para *Bacillus* es de 2 a 3 (Glick, 1995).

***Bacillus subtilis* como promotora de crecimiento.**

Características de *Bacillus subtilis*.

Bacillus subtilis es una bacteria gram positiva, masófila, no patógena, que posee la capacidad de formar esporas ovales o cilíndricas, estructuras altamente resistentes y viables por períodos de tiempo inconmensurables. *B. subtilis* está emparentado filogenéticamente

con patógenos de importancia, tal el caso de *B. anthracis* y *Clostridium sp.*, por lo cual es interesante utilizar esta bacteria como modelo de investigación. Dado que el hábitat natural de *B. subtilis* es el suelo, el cual está sometido a grandes fluctuaciones de temperatura, y dada la importancia que tienen los factores de transcripción Spo0A para la formación de esporas y de Sigma B en la adaptación a otros tipos de estrés, se decidió estudiar la posible relevancia de estos reguladores de la transcripción en la respuesta y adaptación de *B. subtilis* ante un descenso súbito de la temperatura de crecimiento (Méndez, 2004).

Taxonomía de *Bacillus subtilis* (Bergey, 2001).

Reino.....Procariote

Phylum.....Bacteroidetes

Clase.....Sphingobacteria

Orden.....Sphingobacteriales

Familia.....Flexibacteriaceae

Género.....*Bacillus*

Especie.....*subtilis*

Importancia del uso de bacterias promotoras de crecimiento.

El uso de bacterias como promotoras de crecimiento ha despertado gran interés en muchos investigadores, y en la actualidad se está tratando de llevar este interés hasta los agricultores considerando los beneficios que se pueden obtener en caso de que estas bacterias logren adaptarse a las condiciones de un cultivo.

Algunas de las ventajas de utilizar esta bacteria son: no dañan el ecosistema, no se modifica el microhábitat del suelo conservando su microfauna original; para el productor puede resultar bastante redituable considerando que el costo de esta bacteria es muy bajo comparado con el costo de productos químicos convencionales, además de que es de fácil aplicación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del experimento

El trabajo se realizó en el laboratorio e invernadero del departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; localizado en Buenavista Saltillo, Coahuila.

Obtención de la cepa (LPM₁) de *Bacillus subtilis*

La cepa de *Bacillus subtilis* (LPM₁) fue proporcionada por el laboratorio de Parasitología Molecular del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Esta cepa fue aislada de manzano de la región sur del estado de Coahuila.

Incremento de *Bacillus subtilis*

Para esto se utilizaron tres matraces Erlenmeyer con capacidad de 500 ml en los cuales se preparó el medio de cultivo agregando 2 g de Caldo Nutritivo en 250 ml de agua destilada para cada uno de ellos. Una vez disuelto el medio se procedió a esterilizarlo por el método

de autoclave a 16 lbs de presión durante 20 minutos. Pasado este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente para posteriormente agregar a cada matraz un mililitro de la solución bacteriana (*Bacillus subtilis*). Enseguida los matraces se colocaron en un agitador donde permanecieron en agitación constante a 28°C por un período de 7 días.

Conteo de *Bacillus subtilis*

Una vez concluido el período de crecimiento se realizó el conteo de bacterias de cada solución para determinar su concentración. Éste se realizó con ayuda de una cámara de Neubauer; para esto fue necesario realizar una dilución 1:10 para facilitar el conteo dado que fue difícil realizar un conteo directo de la solución por su alta densidad de células bacterianas por mililitro de solución.

Los resultados de este conteo nos dieron una concentración 10^8 en cada uno de los matraces. Finalmente se sellaron los matraces y se colocaron en refrigeración a una temperatura de 4°C para evitar que se modificaran las concentraciones mientras se realizaba la siembra.

Esterilización del sustrato y *Bacillus subtilis*

Tanto el sustrato como la bacteria se esterilizaron por el método de esterilización Autoclave a 16 lbs de presión (125°C) durante 20 minutos. Para la esterilización del sustrato fue necesario colocarlo en bolsas de polietileno para evitar contaminaciones al momento de sacarlo al aire libre; mientras que la bacteria se esterilizó en los mismos matraces donde estaba contenida, dejando uno de ellos sin esterilizar dado que para uno de los tratamientos fue necesario utilizar bacteria no estéril.

Diseño del experimento

Para este experimento se utilizaron cuatro cultivos diferentes: papa (variedad Felsina), frijol (variedad Peruano), calabacita (variedad Zuchini) y maíz; donde a cada uno de ellos se le aplicaron cinco tratamientos con cinco repeticiones por tratamiento.

Los tratamientos usados fueron iguales para todos los cultivos. A continuación se mencionan cada uno de ellos para cada cultivo.

Tratamientos

Papa

T1 = Bacteria (LPM₁) no estéril 10^8 + papa

T2 = Bacteria (LPM₁) estéril 10^8 + papa

T3 = Bacteria (LPM₁) estéril 10^6 + papa

T4 = Bacteria (LPM₁) estéril 10^4 + papa

T5 = Testigo (sin bacteria)

Frijol

T1 = Bacteria (LPM₁) no estéril 10^8 + frijol

T2 = Bacteria (LPM₁) estéril 10^8 + frijol

T3 = Bacteria (LPM₁) estéril 10^6 + frijol

T4 = Bacteria (LPM₁) estéril 10^4 + frijol

T5 = Testigo (sin bacteria)

Calabacita

T1 = Bacteria (LPM₁) no estéril 10^8 + calabacita

T2 = Bacteria (LPM₁) estéril 10^8 + calabacita

T3 = Bacteria (LPM₁) estéril 10^6 + calabacita

T4 = Bacteria (LPM₁) estéril 10^4 + calabacita

T5 = Testigo (sin bacteria)

Maíz

T1 = Bacteria (LPM₁) no estéril 10^8 + maíz

T2 = Bacteria (LPM₁) estéril 10^8 + maíz

T3 = Bacteria (LPM₁) estéril 10^6 + maíz

T4 = Bacteria (LPM₁) estéril 10^4 + maíz

T5 = Testigo (sin bacteria)

Preparación de las macetas y las diferentes concentraciones de *Bacillus subtilis*.

Previo a la siembra de las semillas se prepararon las macetas en las cuales se establecieron los cultivos. Estos se establecieron en vasos de unicel con capacidad de 1 litro, los cuales fueron llenados con el sustrato (peat-most) un día anterior a la siembra; enseguida se agregó agua a cada uno de ellos con el objetivo de humedecer el sustrato y prepararlo para el momento de la siembra.

Las diferentes concentraciones se prepararon de la siguiente manera: Para los tratamientos con concentración 10^8 tanto estéril como no estéril, la bacteria se tomó directamente de los matraces que contenían la solución madre dado que éstos ya se encontraban a esta concentración. Para preparar la concentración 10^6 de bacteria estéril se tomaron 99 ml de agua estéril y a éstos se le agregó 1 ml de la solución madre (10^8). Para preparar la concentración 10^4 se tomaron 99.990 ml de agua estéril y a éstos se le agregaron 10 μ l de la concentración 10^6 .

Siembra de las semillas e inoculación de *Bacillus subtilis*.

Antes de proceder a la siembra de las semillas fue necesario colocar un poco de solución bacteriana de cada uno de los tratamientos en cajas petri para luego colocar las semillas de los diferentes cultivos con sus respectivos tratamientos durante un período de 10 minutos con el objetivo de que éstas se embebieran con la bacteria antes de la siembra.

Pasado este tiempo se realizó la siembra; para esto se colocaron 2 semillas por maceta (a excepción de la papa que únicamente se colocó de un solo tubérculo) y al mismo tiempo se fueron inoculando. Para esto fue necesario tomar un mililitro de cada uno de los tratamientos con ayuda de una pipeta con capacidad de 1 ml y posteriormente agregarlo en la maceta correspondiente. Este proceso fue similar para cada uno de los cultivos. Una vez sembradas e inoculadas las semillas, éstas se cubrieron con un poco de sustrato para permitir su germinación.

Evaluación de los parámetros.

Los parámetros que se evaluaron para cada uno de los cultivos fueron los siguientes: Longitud de tallo, longitud de raíz, longitud de planta completa, peso fresco de tallo, peso fresco de raíz, peso fresco de planta completa, peso seco de tallo, peso seco de raíz y peso seco de planta completa.

La medición de éstos se realizó a los 30 días de establecido el cultivo. Para la medición de las longitudes se utilizó una regla graduada en centímetros y milímetros; para la medición del peso fresco se utilizó una balanza granetaria, y para la medición del peso seco se utilizó una balanza analítica dado que los datos obtenidos eran cantidades inferiores a un gramo de peso.

Para la medición de peso fresco el procedimiento fue el siguiente para todos los cultivos: para esto fue necesario sacar la planta completa con todo y cepellón de las macetas. Enseguida se lavó la planta en una cubeta con agua para retirarle el peat-most adherido a la raíz; una vez retirado todo el peat-most se dejó escurrir la planta por un período aproximado de 20 minutos para poder tomar el peso exclusivamente de la raíz. De igual forma se tomó el peso de tallo (entendiéndose por tallo a la planta con follaje pero sin la raíz) y finalmente el peso de la planta completa. Se repitió el procedimiento para las cuatro especies.

De igual forma, la medición de las longitudes (raíz, tallo y planta completa) se realizó una vez escurrida la planta. Para la medición de la raíz se tomó en cuenta la raíz completa hasta la base del tallo que es donde cambia la coloración de café a verde. Este procedimiento fue el mismo para todas las especies.

Para la medición de peso seco fue necesario dejar secar al ambiente las plantas medidas anteriormente durante un período de dos y tres semanas dependiendo del tiempo que el cultivo lo requiriera. Para la medición de este parámetro se utilizó una balanza analítica considerando que los datos obtenidos fueron cantidades inferiores a un gramo de peso.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados por el método estadístico completamente al azar usando el paquete de diseños experimentales del programa estadístico SAS (Statistical

Analysis System) La comparación de medias se realizó utilizando un nivel de significancia de 0.05.

Para facilitar la interpretación de resultados, los datos se analizaron de manera individual para cada cultivo mediante un diseño completamente al azar y finalmente se realizó un análisis combinado para los cuatro cultivos en cada uno de los parámetros evaluados utilizando el mismo diseño. El objetivo de esto fue hacer una comparación entre cultivos para ver el comportamiento de éstos ante cada tratamiento.

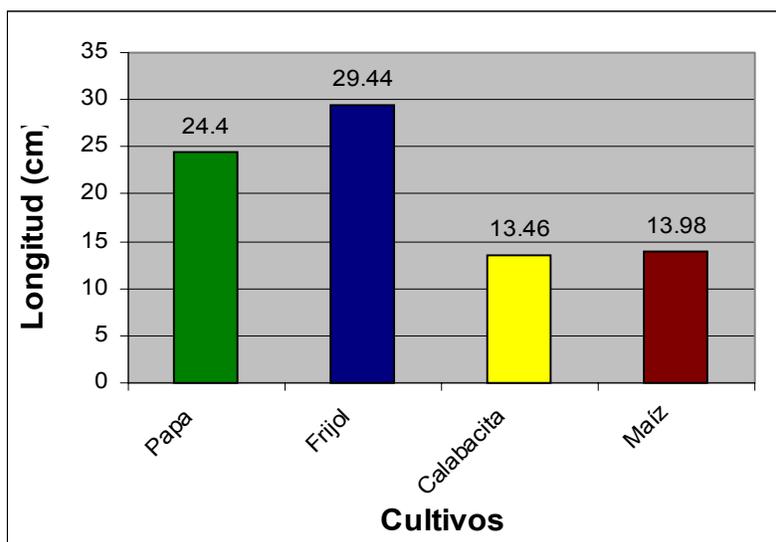
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para facilitar la interpretación de los datos, se eligieron los análisis que integran los cuatro cultivos, evitando así la interpretación de éstos de manera individual.

De esta manera es como se presentan los resultados a continuación:

Longitud de tallo (LT).

Los análisis estadísticos mostraron que el cultivo que mayor respuesta tuvo en cuanto a longitud de tallo se refiere fue el frijol, seguido de la papa, maíz y calabacita (Gráfica no. 1 y Apéndice no. 5), obteniéndose resultados estadísticamente diferentes según el ANVA. Donde los mejores tratamientos para frijol fueron el T4 (10^4 estéril) y T2 (10^8 estéril), los cuales mostraron un mayor crecimiento en comparación con el testigo (Ver Apéndice no. 14); lo cual coincide con los resultados obtenidos por Chávez (2005), donde obtuvo resultados similares en los cultivos de frijol y sorgo.

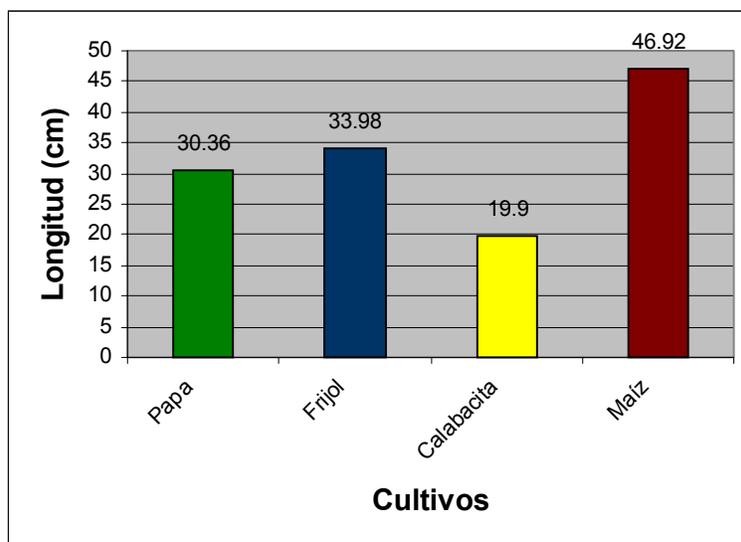


Gráfica no.1.- Comparación entre cultivos de los resultados obtenidos en el parámetro longitud de tallo (LT)

Longitud de raíz (LR).

La especie que mayores resultados mostró para longitud de raíz fue el maíz, donde sí existió diferencia significativa según el ANVA (Ver Apéndice no. 24), seguido por el frijol, papa y calabacita (Gráfica no. 2 y Apéndice no.6). Donde los mejores tratamientos fueron

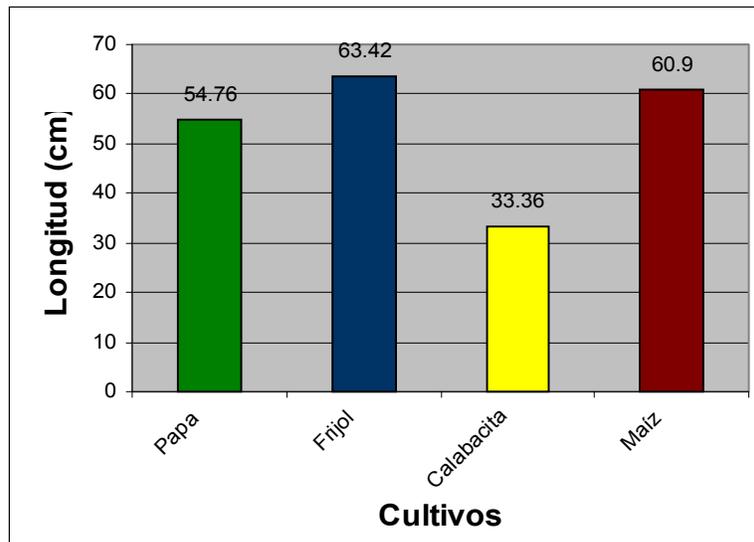
el T4 (10^4 estéril) y T3 (10^6 estéril), al superar ampliamente en un 50% al testigo (Apéndice no. 15). Estos resultados coinciden con los datos obtenidos por Jiménez (2004), al obtener resultados similares con el cultivo de *Arabidopsis thaliana*. Esto confirma lo reportado por Kloepper *et. al.*(1999), quien reporta que cepas de *Bacillus subtilis* tienen la capacidad de incrementar el desarrollo radicular de las plantas, lo cual repercute en un incremento en la producción.



Gráfica no. 2.- Comparación entre cultivos de los resultados obtenidos en el parámetro longitud de raíz (LR).

Longitud de planta completa (LPC).

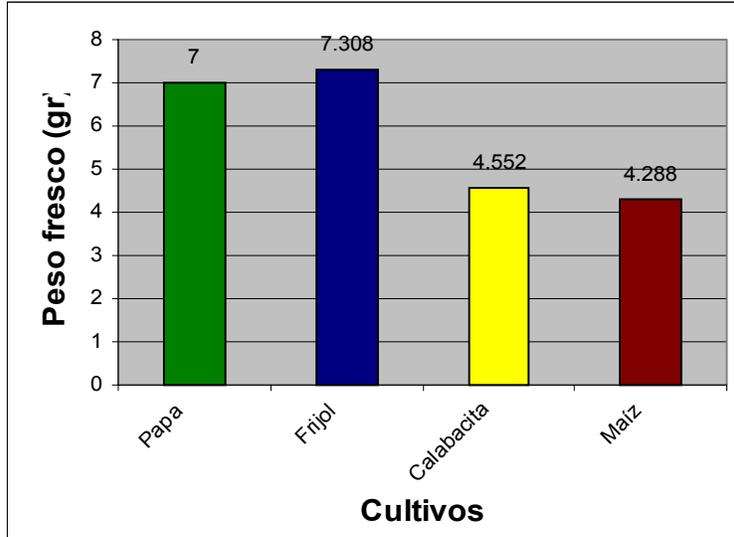
Los mejores resultados se obtuvieron con el cultivo de frijol, seguido por el maíz (Ver apéndice no. 22), papa y calabacita (Gráfica no. 3 y Apéndice no. 7) donde los resultados son diferentes estadísticamente según el ANVA. Para este caso los mejores tratamientos fueron el T2 (10^8 estéril) y T1 (10^8 no estéril), los cuales superaron al testigo en un 24 y 13% respectivamente (Ver apéndice no. 16). Estos resultados, al igual que en los parámetros anteriores, los tratamientos con bacteria estéril han superado a los tratamientos con bacteria no estéril; lo cual coincide con lo mencionado por Méndez (2004), quien en su reporte menciona que *Bacillus subtilis* muta formando genes de transcripción los cuales le permiten resistir condiciones adversas como estrés, cambios bruscos de temperatura, entre otros.



Gráfica no.3.- Comparación entre cultivos de los resultados obtenidos en el parámetro longitud de planta completa (LPC).

Peso fresco de tallo (PFT).

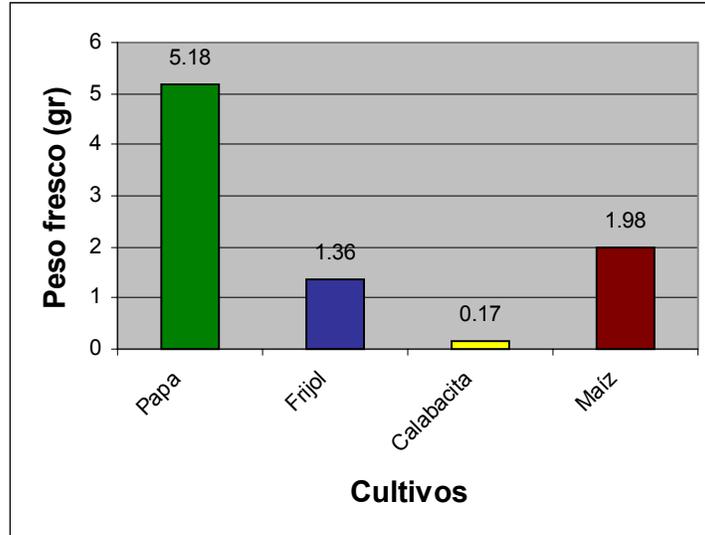
Los resultados más altos se obtuvieron con el cultivo de frijol (según el ANVA) seguido por la papa, calabacita y maíz (Gráfica no. 4 y Apéndice no. 8). Donde los mejores tratamientos fueron el T2 (10^8 estéril) y T3 (10^6 estéril), los cuales superaron al testigo en un 23 y 12% respectivamente (Ver apéndice no. 17). Nuevamente *Bacillus subtilis* estéril dio mejores resultados que *Bacillus subtilis* no estéril. Esto coincide con los resultados obtenidos en el parámetro Longitud de tallo donde también el cultivo que mayores resultados presentó fue el frijol. Esto nos explica que existe una relación directamente proporcional entre Longitud de tallo y Peso fresco de tallo.



Gráfica no. 4.- Comparación entre cultivos de los resultados obtenidos en el parámetro peso fresco de tallo (PFT).

Peso fresco de raíz (PFR).

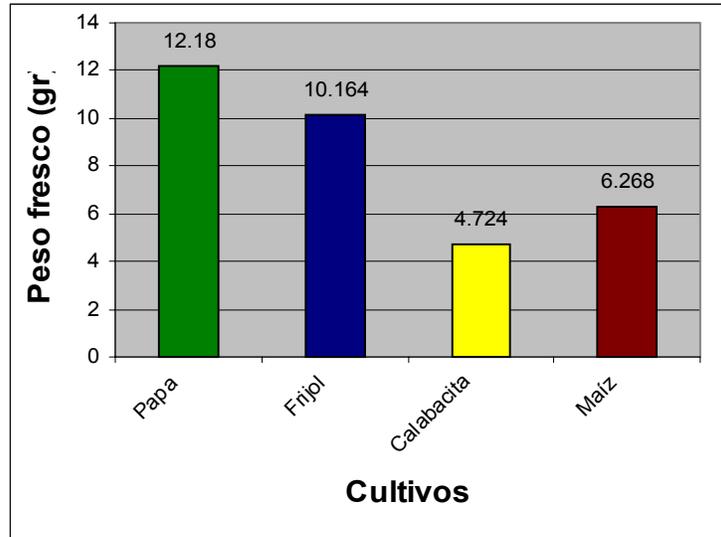
Los mejores resultados se obtuvieron con el cultivo de papa, seguido por el maíz, frijol y calabacita (Gráfica no. 5 y Apéndices no. 9 y 23), siendo estadísticamente diferente según el ANVA. Donde los mejores tratamientos fueron el T1 (10^8 no estéril) y T2 (10^8 estéril), los cuales superaron al testigo en un 49 y 47% respectivamente (Ver apéndice no. 18). Sin embargo, no coincide con los resultados obtenidos en el parámetro Longitud de raíz donde los mejores resultados se obtuvieron con el cultivo de maíz. Aunque cabe aclarar que Buyer *et al.* (1999), en su reporte menciona que el crecimiento radicular puede verse afectado por factores como aireación, espacio, genotipo de la planta, pH, etc. Por tal motivo, es razonable pensar que en este trabajo las plantas tuvieron un factor limitante que fue el espacio.



Gráfica no. 5.- Comparación entre cultivos de los resultados obtenidos en el parámetro peso fresco de raíz (PFR).

Peso fresco de planta completa (PFPC).

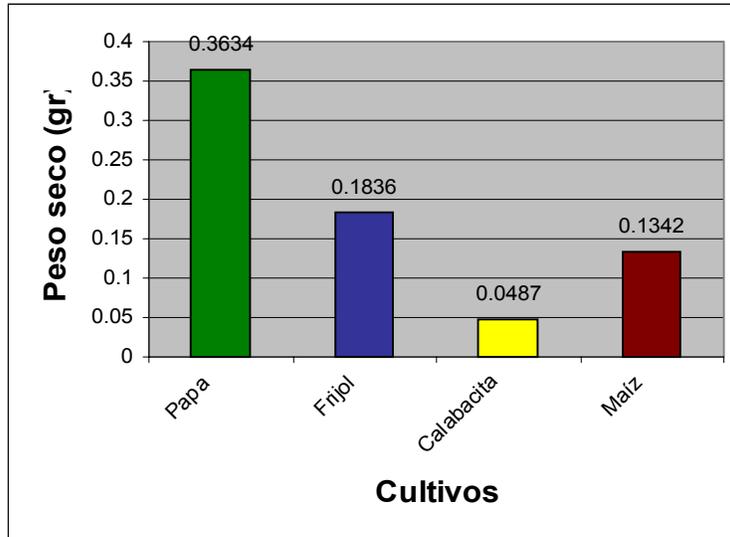
Para peso fresco de planta completa los resultados más altos se obtuvieron con el cultivo de papa, seguido por el frijol, maíz y calabacita (Gráfica no. 6 y Apéndice no. 10), existiendo diferencia significativa según el ANVA. Para este caso los mejores tratamientos fueron el T2 (10^8 estéril) y T1 (10^8 no estéril), los cuales superaron al testigo en un 65 y 60% respectivamente (Ver apéndice no. 19). Estos resultados coinciden con lo obtenido por Chávez (2005), quien menciona que *Bacillus subtilis* es capaz de hacer crecer y aumentar el número de células en los tejidos reduciendo el tiempo de generación y sin requerimientos nutricionales complejos.



Gráfica no. 6.- Comparación entre cultivos de los resultados obtenidos en el parámetro Peso fresco de planta completa (PFPC).

Peso seco de raíz (PSR).

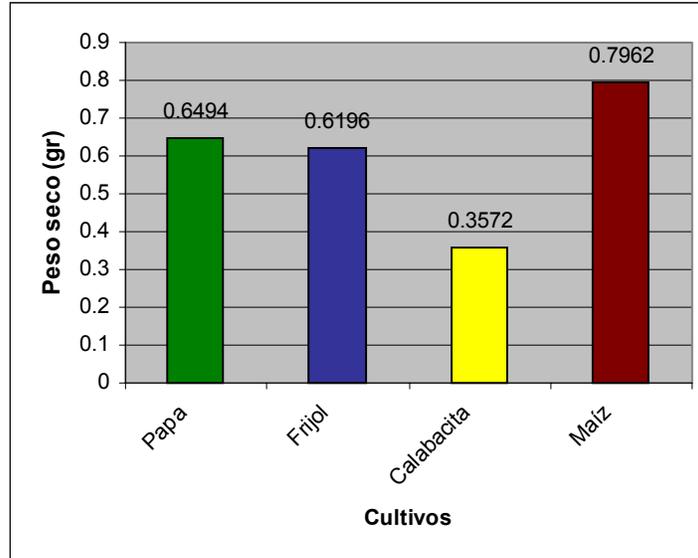
Los mejores resultados (Según el ANVA) se obtuvieron con el cultivo de papa, seguido por el frijol, maíz y calabacita (Gráfica no. 7 y Apéndice no. 11). Donde los mejores tratamientos fueron el T1 (10^8 no estéril) y T2 (10^8 estéril), los cuales superaron al testigo en un 32 y 30% respectivamente (Ver apéndice no. 19). Estos resultados son coherentes con los obtenidos en el parámetro Peso fresco de raíz, donde también los mejores resultados se obtuvieron con el cultivo de papa. Esto nos indica que para este cultivo existe una relación directa entre la producción de materia fresca y el contenido de materia seca.



Gráfica no. 7.-Comparación entre cultivos de los resultados obtenidos en el parámetro peso seco de raíz (PSR)

Peso seco de tallo (PST).

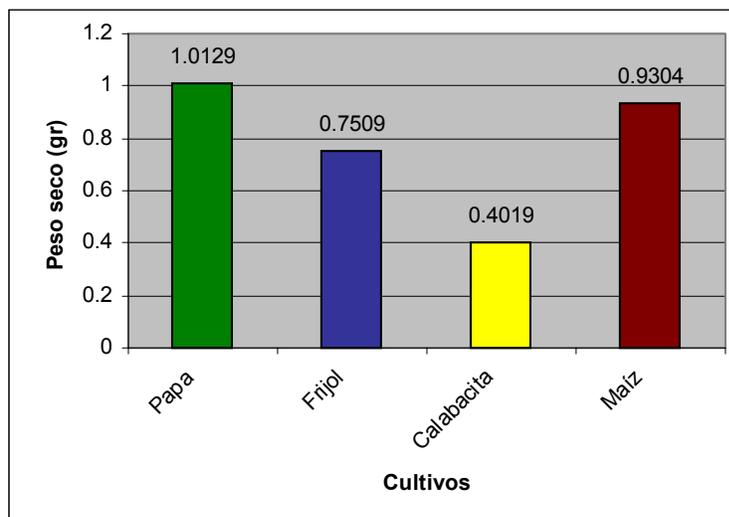
El cultivo que mayor respuesta presentó con respecto a este parámetro fue el maíz, seguido por la papa, frijol y calabacita (Gráfica no. 8 y Apéndice no. 12). Donde los mejores tratamientos fueron el T1 (10^8 no estéril) y T2 (10^8 estéril), los cuales superaron al testigo en un 53 y 47% respectivamente (Apéndice no 20). El cultivo de papa fue el más coherente entre los parámetros Peso fresco de tallo y Peso seco de tallo; lo cual nos indica que es el cultivo más eficiente en la producción de biomasa al registrar la mínima diferencia entre peso fresco y peso seco de tallo.



Gráfica no. 8.-Comparación entre cultivos de los resultados obtenidos en el parámetro peso seco de tallo (PST).

Peso seco de planta completa (PSPC).

Los resultados más altos se obtuvieron con el cultivo de papa, seguido del cultivo de maíz, frijol y calabacita (Gráfica no. 9 y Apéndice no. 13) (existiendo diferencia significativa entre ellos según el ANVA. Donde los mejores tratamientos fueron el T2 (10^8 estéril) y T1 (10^8 no estéril), los cuales superaron al testigo en un 55 y 52% respectivamente (Ver Apéndice no. 21). Estos resultados nos llevan a la conclusión de que las plantas tratadas con *Bacillus subtilis* se hacen más eficientes en cuanto a producción de biomasa. Para el caso de papa, que fue el cultivo que mayor respuesta tuvo al ser tratado con esta bacteria, se puede esperar una mayor producción de tubérculos dado que esta bacteria estimula a la planta a la formación de nuevas raíces y como consecuencia mayor cantidad de tubérculos.



Gráfica no. 9.- Comparación entre cultivos de los resultados obtenidos en el parámetro peso seco de planta completa (PSPC).

Una vez analizados todos los datos, se puede observar que sí existió diferencia significativa (Según el ANVA) entre cultivos; es decir, que cada uno de ellos se comporta de manera diferente al ser tratado con *Bacillus subtilis*. Observando estas diferencias podemos ver que el cultivo de la familia de las cucurbitáceas no logró asociarse de manera eficiente con la bacteria, lo cual sí sucedió con los cultivos de las familias de solanáceas, poáceas y fabáceas. Por lo tanto, podemos concluir que en los cultivos de las últimas tres familias existe un incremento en tamaño de manera importante.

CONCLUSIÓN

La cepa LPM₁ de *Bacillus subtilis* aislada de la rizósfera de manzano promueve el crecimiento vegetativo de los cultivos de papa, frijol, calabacita y maíz; mostrando resultados positivos cuando es aplicada tanto al natural como en condiciones de esterilidad.

LITERATURA CITADA

- Beauchamp, C. J., Dion, O., Kloepper, J. W. and Antoun, H. 1991. Physiological characterization of opina utilization rhizobacteria for traits related to plant growth promoting activity. *Plant and soil*. 132:273-279.
- Bergey's, 2001. *Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd. Edition. Vol. 1. 836 p. Springer, New York.
- Bloemberg, G. V., y Lugtenberg, B. J. J. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:343-350.
- Buyer, J. S., Roberts, D. P. y Russek-Cohen, E. 1999. Microbial community structure and function in the spermosphere as affected by soil and seed, type. *Can. J. Microbiol.* 45: 138-144.
- Cattelan, A. J., Harlet, R. G. and Furhmann, J. J. 1998. Screening for plant growth promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63:1670-1680.
- Chávez, B. C. 2005. Uso de rizobacterias para el control de hongos fitopatógenos y promoción de desarrollo de plantas. Tesis Maestría. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila. 56 p.

- Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41:109-117.
- Hernández, D. M. y Charloux, M. L. 2001. La nutrición mineral y la biofertilización en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Temas de ciencia y tecnología.* 5:11-27.
- Hong Y., Glick, B. R., y Pasternak, J. J. 1991. Plant-microbial interaction under gnotobiotic condition: A scanning electron microscope study. *Current Microbiol.* 23:111-114.
- Jiménez, D. M. R. 2004. Péptidos secretados por *Bacillus subtilis* que modifican la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctorado. CINVESTAV. Unidad Irapuato Gto. México. 85p.
- Kende, H. and Zeevart, J. A. D. 1997. The five “classical” plant hormones. *Plant Cell.* 9:1197-1210.
- Kloepper, J. W., Lifshitz, R., Zablotowicz, M. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7: 39-44.
- Lazarovits, G. and Nowak, J. 1997. Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. *HortScience.* 32:188-197.
- Mayak, S. Tirosh, T., Glick, B. R. 1999. Effect of wild-type and mutant plant growth-promoting rhizobacteria the rooting of mung bean cuttings. *J. Plant Growth Regul.* 18: 49-53.

Méndez, B. M. 2004. Novel roles of the master transcription factor Spo0a and Sigma B for survival and sporulation of *Bacillus subtilis* at low growth temperature. *Journal of Bacteriology*. 186(4) 989-1000, 2004.

Persello-Cartienaux, F., Pascale, D., Sarrobert, C., Thiabund, M. C., Achouak, W., Robaglia, C. and Nussaume, L. 2001. Utilization of mutants to analyze the interaction between *Arabidopsis thaliana* and its naturally root-associated *Pseudomonas*. *Planta*. 212:190-198.

Shah, S., Li, J., Moffatt, B. A. and Glick, B. R. 1998. Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth promoting rhizobacteria. *Can. J. Microbiol.* 44:833-843.

Smith, K. P. y Goodman, R. M. 1999. Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. *Annual Review of Phytopathology*. 37:473-491.

Van Loon, L. C., Bakker, P. A. and Pieterse, M. J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 36:456-486.

Yang, S. F. y Hoffman, N. E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35:155-189.

Página de internet:

<http://www.bioland.cl/mo-biobac.htm>

APENDICE

Apéndice 1.-Datos originales para el cultivo de papa.

	LT	LR	LPC	PFT	PFR	PFPC	PSR	PST	PSPC
T1R1	34	32	66	9	5	14	0.329	0.879	1.208
T1R2	27	36	63	8.1	3.5	11.6	0.306	0.858	1.164
T1R3	22	48	70	12.3	10.4	22.7	0.629	1.162	1.791
T1R4	24	28	52	7.4	6.6	14	0.494	0.801	1.295
T1R5	17	37	54	7.1	7.6	14.7	0.501	0.528	1.029
T2R1	30	34	64	8.2	5.9	14.1	0.317	0.93	1.247
T2R2	29	26	55	8.5	4	12.5	0.218	0.601	0.819
T2R3	22	40	62	11	8	19	0.564	1.105	1.669
T2R4	38	31	69	14.5	6	20.5	0.381	1.147	1.528
T2R5	22	35	57	11.5	8.4	19.9	0.727	0.825	1.552
T3R1	29	24	53	5.9	8.1	14	0.534	0.654	1.188
T3R2	22	32	54	9.2	6.8	16	0.434	0.754	1.188
T3R3	23	28	51	8.1	4.2	12.3	0.288	0.567	0.855
T3R4	35	23	58	8.3	2.1	10.4	0.121	0.586	0.707
T3R5	14	26	40	5	4.3	9.3	0.379	0.536	0.915
T4R1	26	31	57	4	7	11	0.475	0.593	1.068
T4R2	32	25	57	5.2	5	10.2	0.324	0.617	0.941
T4R3	28	31	59	7.8	5.7	13.5	0.414	0.735	1.149
T4R4	25	26	51	5.5	0.9	6.4	0.109	0.325	0.434
T4R5	10	28	38	2.3	3	5.3	0.258	0.214	0.472
T5R1	22	29	51	3.9	4.6	8.5	0.333	0.562	0.895
T5R2	23	27	50	1.5	2.5	4	0.194	0.135	0.329

T5R3	22	24	46	3.5	4.5	8	0.344	0.526	0.87
T5R4	17	21	38	4.2	2.6	6.8	0.195	0.359	0.554
T5R5	17	37	54	3	2.8	5.8	0.219	0.238	0.457

LT.- Longitud de tallo; LR.- Longitud de raíz; LPC.- Longitud de planta completa; PFT.- Peso fresco de tallo; PFR.- Peso fresco de raíz; PFPC.- Peso fresco de planta completa; PSR.- Peso seco de raíz; PST.- Peso seco de tallo; PSPC.- Peso seco de planta completa.

Apéndice 2.- Datos originales para el cultivo de frijol

	LT	LR	LPC	PFT	PFR	PFPC	PSR	PST	PSPC
T1R1	30	32	62	7.7	1.3	14	0.617	0.646	0.813
T1R2	27	38	65	7.3	1	11.6	0.109	0.617	0.726
T1R3	35	25	60	8.4	0.1	22.7	0.88	0.633	0.721
T1R4	32	33	65	7	1.2	14	0.084	0.542	0.626
T1R5	22	46	68	5.6	0.2	14.7	0.051	0.37	0.421
T2R1	32	33	65	9	1.7	10.7	0.141	0.725	0.866
T2R2	32	35	67	8.1	0.6	8.7	0.164	0.824	0.988
T2R3	29.5	50.5	80	9	3.5	12.5	0.254	0.867	1.121
T2R4	29	42	71	7.8	4.2	12	0.333	0.78	1.113
T2R5	26	35	61	7.8	1.7	9.5	0.133	0.703	0.836
T3R1	32	33	65	6.9	1.6	8.5	0.205	0.677	0.882
T3R2	20	29	49	5	0.3	5.3	0.063	0.428	0.491
T3R3	29	29	58	8.5	0.5	9	0.115	0.767	0.882
T3R4	30	31	61	7	2.2	9.2	0.177	0.59	0.767
T3R5	33.5	29	62.5	9	1.5	10.5	0.082	0.688	0.77
T4R1	36.5	32	68.5	8.3	1.2	9.5	0.133	0.651	0.784
T4R2	30	29	59	8.5	1.5	10	0.125	0.636	0.761
T4R3	33	37	70	7.6	4.7	12.3	0.294	0.735	1.029
T4R4	21.5	34	55.5	4.8	0.3	5.1	0.048	0.368	0.416
T4R5	31.5	33	64.5	7	0.6	7.6	0.103	0.565	0.668
T5R1	34	43	77	8.3	2	10.3	0.139	0.687	0.826
T5R2	22.5	15	37.5	5.3	0.1	5.4	0.033	0.388	0.421
T5R3	25	23	48	3.4	0.1	3.5	0.052	0.24	0.292
T5R4	29	40	69	6.3	0.6	6.9	0.087	0.517	0.604
T5R5	34	43	77	9.1	1.5	10.6	0.169	0.78	0.949

LT.- Longitud de tallo; LR.- Longitud de raíz; LPC.- Longitud de planta completa; PFT.- Peso fresco de tallo; PFR.- Peso fresco de raíz; PFPC.- Peso fresco de planta completa; PSR.- Peso seco de raíz; PST.- Peso seco de tallo; PSPC.- Peso seco de planta completa.

Apéndice 3.- Datos originales para el cultivo de calabacita

	LT	LR	LPC	PFT	PFR	PFPC	PSR	PST	PSPC
T1R1	19	19	38	4.6	0.1	4.7	0.033	0.28	0.313
T1R2	14	16	30	4.4	0.1	4.5	0.029	0.279	0.308
T1R3	14	17	31	6.7	0.3	7	0.06	0.506	0.566

T1R4	13	17	30	4.7	0.2	4.9	0.025	0.415	0.44
T1R5	14	16	30	6.7	0.6	7.3	0.11	0.571	0.681
T2R1	12	10	22	4.9	0.1	5	0.047	0.375	0.422
T2R2	13	29	42	6.4	0.7	7.1	0.059	0.618	0.677
T2R3	14	22	36	4.6	0.1	4.7	0.028	0.356	0.384
T2R4	13	21	34	4.5	0.1	4.6	0.032	0.318	0.35
T2R5	13	23	36	5	0.1	5.1	0.019	0.361	0.38
T3R1	13.5	18.5	32	4.8	0.1	4.9	0.026	0.342	0.368
T3R2	12	18	30	3.3	0.1	3.4	0.026	0.297	0.323
T3R3	12	22	34	6.7	0.2	6.9	0.064	0.509	0.573
T3R4	14	26	40	2.2	0.1	2.3	0.016	0.122	0.138
T3R5	12	14	26	5.2	0.1	5.3	0.023	0.359	0.382
T4R1	13	12	25	4.6	0.2	4.8	0.39	0.433	0.823
T4R2	15	13	28	3.6	0.1	3.7	0.016	0.252	0.268
T4R3	12	17	29	6.2	0.1	6.3	0.025	0.555	0.58
T4R4	12	19	31	1.5	0.1	1.6	0.025	0.111	0.136
T4R5	12	34	46	3.1	0.1	3.2	0.032	0.147	0.179
T5R1	13	21	34	2.4	0.1	2.5	0.023	0.121	0.144
T5R2	10	21	31	1.5	0.1	1.6	0.017	0.097	0.114
T5R3	16	19	35	6.4	0.1	6.5	0.032	0.67	0.702
T5R4	16	32	48	6.5	0.3	6.8	0.045	0.635	0.58
T5R5	15	21	36	3.3	0.1	3.4	0.016	0.202	0.218

LT.- Longitud de tallo; LR.- Longitud de raíz; LPC.- Longitud de planta completa; PFT.- Peso fresco de tallo; PFR.- Peso fresco de raíz; PFPC.- Peso fresco de planta completa; PSR.- Peso seco de raíz; PST.- Peso seco de tallo; PSPC.- Peso seco de planta completa.

Apéndice 4.-Datos originales para el cultivo de maíz

	LT	LR	LPC	PFT	PFR	PFPC	PSR	PST	PSPC
T1R1	20	38	58	7.5	5.5	13	0.161	1.743	1.904
T1R2	17	29	46	5	4.5	9.5	0.137	0.861	0.998
T1R3	14	60	74	3.4	4.6	8	0.142	0.632	0.774
T1R4	15	64	79	4.1	4.6	8.7	0.163	0.77	0.933
T1R5	15	45	60	6	5.2	11.2	0.188	1.06	1.248
T2R1	14.5	41.5	56	4.7	3.9	8.6	0.131	0.933	1.064
T2R2	13	35	48	4.9	1.5	6.4	0.15	0.802	0.952
T2R3	16	49	65	3.3	3.9	7.2	0.111	0.588	0.699
T2R4	13	44	57	4.4	0.5	4.9	0.101	0.737	0.838
T2R5	14	46	60	8.2	2.2	10.4	0.283	1.48	1.763
T3R1	16	55	71	4.8	1.3	6.1	0.154	0.969	1.123
T3R2	14.5	45	59.5	4.4	1	5.4	0.117	0.772	0.889
T3R3	12	71	83	4.3	0.7	5	0.109	0.791	0.9
T3R4	14.5	45.5	60	4.3	1.1	5.4	0.123	0.743	0.866
T3R5	11	46	57	1.8	1.2	3	0.076	0.321	0.397
T4R1	13	46	59	4.2	0.9	5.1	0.111	0.762	0.873
T4R2	13	49	62	3.2	0.5	3.7	0.082	0.71	0.792

T4R3	13	33	46	2.5	0.3	2.8	0.102	0.302	0.404
T4R4	15	49	64	6.1	1.5	7.6	0.156	1.2	1.356
T4R5	15	90	105	5.4	1.5	6.9	0.17	1.315	1.485
T5R1	15	53	68	3.8	0.7	4.5	0.099	0.626	0.725
T5R2	13	31	44	2.6	0.4	3	0.095	0.456	0.551
T5R3	13	43	56	3.3	0.5	3.8	0.132	0.573	0.705
T5R4	10	16	26	2.4	0.2	2.6	0.127	0.454	0.581
T5R5	10	49	59	2.6	1.3	3.9	0.135	0.306	0.441

LT.- Longitud de tallo; LR.- Longitud de raíz; LPC.- Longitud de planta completa; PFT.- Peso fresco de tallo; PFR.- Peso fresco de raíz; PFPC.- Peso fresco de planta completa; PSR.- Peso seco de raíz; PST.- Peso seco de tallo; PSPC.- Peso seco de planta completa.

Apéndice 5.- Comparación de medias entre cultivos de los análisis obtenidos para el parámetro Longitud de tallo (LT).

Grupo	Media (cm)	N	Especie
A	29.440	25	2
B	24.400	25	1
C	13.980	25	4
C			
C	13.460	25	3

Alpha: 0.05 C.V.: 21.29 The SAS System
Especie 1: Papa; Esp. 2: Frijol; Esp. 3: Calabacita; Esp. 4: Maíz

Apéndice 6.- Comparación de medias entre cultivos de los análisis obtenidos para el parámetro Longitud de raíz (LR).

Grupo	Media (cm)	N	Especie
A	46.920	25	4
B	33.980	25	2
B			
B	30.360	25	1
C	19.900	25	3

Alpha: 0.05 C.V.: 27.82 The SAS System
Especie 1: Papa; Esp. 2: Frijol; Esp. 3: Calabacita; Esp. 4: Maíz

Apéndice 7.- Comparación de medias entre cultivos de los análisis obtenidos para el parámetro Longitud de planta completa (LPC).

Grupo	Media (cm)	N	Especie
A	63.420	25	2
A			
A	60.900	25	4
B	54.760	25	1
C	33.360	25	3

Alpha: 0.05 C.V.: 18.85 The SAS System
 Especie 1: Papa; Esp. 2: Frijol; Esp. 3: Calabacita; Esp. 4: Maíz

Apéndice 8.- Comparación de medias entre cultivos de los análisis obtenidos para el parámetro Peso fresco de tallo (PFT).

Grupo	Media (gr)	N	Especie
A	7.3080	25	2
A			
A	7.0000	25	1
B	4.5520	25	3
B			
B	4.2880	25	4

Alpha: 0.05 C.V.: 28.42 The SAS System
 Especie 1: Papa; Esp. 2: Frijol; Esp. 3: Calabacita; Esp. 4: Maíz

Apéndice 9.- Comparación de medias entre cultivos de los análisis obtenidos para el parámetro Peso fresco de tallo (PFR).

Grupo	Media (gr)	N	Especie
A	5.1800	25	1
B	1.9800	25	4
B			
B	1.3680	25	2
C	0.1720	25	3

Alpha: 0.05
Especie 1: Papa; Esp. 2: Frijol; Esp. 3: Calabacita; Esp. 4: Maíz

C.V.: 58.69

The SAS System

Apéndice 10.- Comparación de medias entre cultivos de los análisis obtenidos para el parámetro Peso fresco de planta completa (PFPC).

Grupo	Media (gr)	N	Especie
A	12.1800	25	1
B	10.1640	25	2
C	6.2680	25	4
D	4.7240	25	3

Alpha: 0.05
Especie 1: Papa; Esp. 2: Frijol; Esp. 3: Calabacita; Esp. 4: Maíz

C.V.: 29.85

The SAS System

Apéndice 11.- Comparación de medias entre cultivos de los análisis obtenidos para el parámetro Peso seco de raíz (PSR).

Grupo	Media (gr)	N	Especie
A	0.36348	25	1
B	0.18364	25	2
B	0.13420	25	4
C	0.04872	25	3

Alpha: 0.05
Especie 1: Papa; Esp. 2: Frijol; Esp. 3: Calabacita; Esp. 4: Maíz

C.V.: 68.49

The SAS System

Apéndice 12.- Comparación de medias entre cultivos de los análisis obtenidos para el parámetro Peso seco de raíz (PST).

Grupo	Media (gr)	N	Especie
A	0.79624	25	4
B	0.64948	25	1
B	0.61696	25	2

C 0.35724 25 3

Alpha: 0.05 C.V.: 37.05 The SAS System
 Especie 1: Papa; Esp. 2: Frijol; Esp. 3: Calabacita; Esp. 4: Maíz

Apéndice 13.- Comparación de medias entre cultivos de los análisis obtenidos para el parámetro Peso seco de planta completa (PSPC).

Grupo	Media (gr)	N	Especie
A	1.01296	25	1
A			
A	0.93044	25	4
B	0.75092	25	2
C	0.40196	25	3

Alpha: 0.05 C.V.: 35.23 The SAS System
 Especie 1: Papa; Esp. 2: Frijol; Esp. 3: Calabacita; Esp. 4: Maíz

Apéndice 14.- Comparación de medias entre tratamientos de los análisis obtenidos para el parámetro Longitud de tallo (LT) en el cultivo de frijol.

Grupo	Media (cm)	N	Tratamientos
A	30.500	5	T4
A			
A	29.700	5	T2
A			
A	29.200	5	T1
A			
A	28.900	5	T3
A			
A	28.900	5	T5

Alpha: 0.05 The SAS System

Tratamiento 1: Bacteria 10^8 no estéril; trat. 2: bact. 10^8 estéril; trat.3: bact. 10^6 estéril; trat. 4: bact. 10^4 estéril ; trat. 5 : testigo.

Apéndice 15.- Comparación de medias entre tratamientos de los análisis obtenidos para el parámetro Longitud de raíz (LR) en el cultivo de maíz.

Grupo	Media (cm)	N	Tratam.
A	53.400	5	T4
A			
A	52.500	5	T3
A			
A	47.200	5	T1
A			
A	43.100	5	T2
A			
A	38.400	5	T5

Alpha: 0.05 The SAS System

Tratamiento 1: Bacteria 10^8 no estéril; trat. 2: bact. 10^8 estéril; trat.3: bact. 10^6 estéril; trat. 4: bact. 10^4 estéril ; trat. 5 : testigo.

Apéndice 16.- Comparación de medias entre tratamientos de los análisis obtenidos para el parámetro Longitud de planta completa (LPC) en el cultivo de frijol.

Grupo	Media (cm)	N	Tratam.
A	68.800	5	T2
A			
A	64.000	5	T1
A			
A	63.500	5	T4
A			
A	61.700	5	T5
A			
A	59.100	5	T3

Alpha: 0.05 The SAS System

Tratamiento 1: Bacteria 10^8 no estéril; trat. 2: bact. 10^8 estéril; trat.3: bact. 10^6 estéril; trat. 4: bact. 10^4 estéril ; trat. 5 : testigo.

Apéndice 17.- Comparación de medias entre tratamientos de los análisis obtenidos para el parámetro Peso fresco de tallo (PFT) en el cultivo de frijol.

Grupo	Media (gr)	N	Tratam.
A	8.3400	5	T2
A			
A	7.2800	5	T3
A			
A	7.2400	5	T4
A			
A	7.2000	5	T1
A			
A	6.4800	5	T5

Alpha: 0.05 The SAS System

Tratamiento 1: Bacteria 10^8 no estéril; trat. 2: bact. 10^8 estéril; trat.3: bact. 10^6 estéril; trat. 4: bact. 10^4 estéril ; trat. 5: testigo.

Apéndice 18.- Comparación de medias entre tratamientos de los análisis obtenidos para el parámetro Peso fresco de raíz (PFR) en el cultivo de papa.

Grupo	Media (gr)	N	Tratam.
A	6.620	5	T1
A			
A	6.460	5	T2
A			
B A	5.100	5	T3
B A			
B A	4.320	5	T4
B			
B	3.400	5	T5

Alpha: 0.05 The SAS System

Tratamiento 1: Bacteria 10^8 no estéril; trat. 2: bact. 10^8 estéril; trat.3: bact. 10^6 estéril; trat. 4: bact. 10^4 estéril ; trat. 5: testigo.

Apéndice 19.- Comparación de medias entre tratamientos de los análisis obtenidos para el parámetro Peso fresco de planta completa (PFPC) en el cultivo de papa.

Grupo	Media (gr)	N	Tratam.
A	17.200	5	T2
A			
B A	15.400	5	T1
B			
B C	12.400	5	T3

	C			
D	C	9.280	5	T4
D				
D		6.620	5	T5

Alpha: 0.05 The SAS System

Tratamiento 1: Bacteria 10^8 no estéril; trat. 2: bact. 10^8 estéril; trat.3: bact. 10^6 estéril; trat. 4: bact. 10^4 estéril ; trat. 5: testigo.

Apéndice 19.- Comparación de medias entre tratamientos de los análisis obtenidos para el parámetro Peso seco de raíz (PSR) en el cultivo de papa.

Grupo	Media (gr)	N	Tratam.
A	0.45180	5	T1
A			
A	0.44140	5	T2
A			
A	0.35120	5	T3
A			
A	0.31600	5	T4
A			
A	0.25700	5	T5

Alpha: 0.05 The SAS System

Tratamiento 1: Bacteria 10^8 no estéril; trat. 2: bact. 10^8 estéril; trat.3: bact. 10^6 estéril; trat. 4: bact. 10^4 estéril ; trat. 5: testigo.

Apéndice 20.- Comparación de medias entre tratamientos de los análisis obtenidos para el parámetro Peso seco de tallo (PST) en el cultivo de maíz.

Grupo	Media (gr)	N	Tratam.
A	1.0132	5	T1
A			
B A	0.9080	5	T2
B A			
B A	0.8578	5	T4
B A			
B A	0.7192	5	T3
B			
B	0.4830	5	T5

Alpha: 0.05 The SAS System

Tratamiento 1: Bacteria 10^8 no estéril; trat. 2: bact. 10^8 estéril; trat.3: bact. 10^6 estéril; trat. 4: bact. 10^4 estéril ; trat. 5: testigo.

Apéndice 21.- Comparación de medias entre tratamientos de los análisis obtenidos para el parámetro Peso seco de planta completa (PSPC) en el cultivo de papa.

Grupo	Media (gr)	N	Tratam.
A	1.3630	5	T2
A			
B A	1.2974	5	T1
B			
B C	0.9706	5	T3
C			
C	0.8128	5	T4
C			
C	0.6210	5	T5

Alpha: 0.05 The SAS System

Tratamiento 1: Bacteria 10^8 no estéril; trat. 2: bact. 10^8 estéril; trat.3: bact. 10^6 estéril; trat. 4: bact. 10^4 estéril ; trat. 5: testigo.



Apéndice 22.- Plantas de maíz tratadas con *Bacillus subtilis* (Izquierda) comparadas con plantas no tratadas (Derecha).



Apéndice 23.- Planta de papa tratada con *B. subtilis* (Izq.) comparada con una no tratada (Der.)



Apéndice 24.-Planta de maíz tratada Con *B. subtilis* (Izq.) comparada con una no tratada (Der.).



Apéndice 25.- Planta de calabacita tratada con *B. subtilis* (Der.) comparada con una no tratada (Izq).