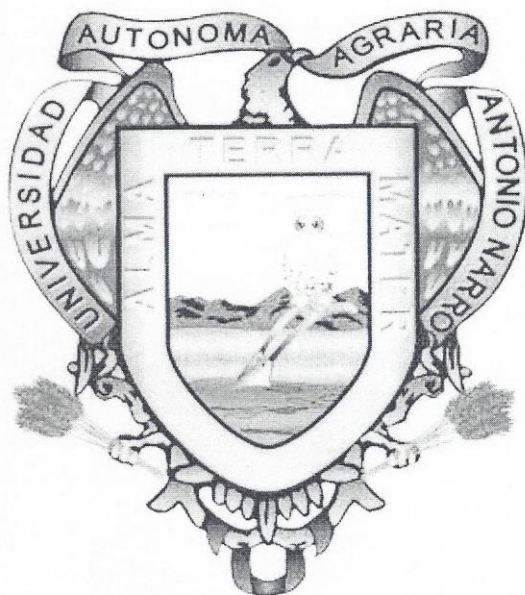


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS



“Bacillus megaterium (de Bary, 1884) NATIVA DE LA REGIÓN LAGUNERA, COMO BACTERIA PROMOTORA DE CRECIMIENTO VEGETAL”

POR:

JUAN PABLO WENCESLAO ORTIZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN AGROECOLOGÍA

Torreón, Coahuila, México

Diciembre de 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

"*Bacillus megaterium* (de Bary, 1884) NATIVA DE LA REGIÓN LAGUNERA, COMO BACTERIA PROMOTORA DE CRECIMIENTO VEGETAL"

TESIS QUE PRESENTA:

JUAN PABLO WENCESLAO ORTIZ

QUE SOMETE A CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR:

PRESIDENTE:



Dr. Jesús Vásquez Arroyo

VOCAL:



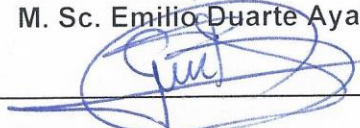
M.C. Eduardo Blanco Contreras

VOCAL:

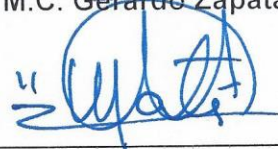


M. Sc. Emilio Duarte Ayala

VOCAL SUPLENTE:



M.C. Gerardo Zapata Sifuentes



M.C. Víctor Martínez Cueto
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

DICIEMBRE DE 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

“*Bacillus megaterium* (de Bary, 1884) NATIVA DE LA REGIÓN LAGUNERA, COMO BACTERIA PROMOTORA DE CRECIMIENTO VEGETAL”

TESIS QUE PRESENTA:

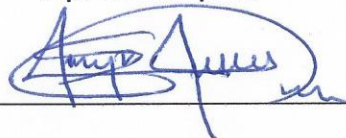
JUAN PABLO WENCESLAO ORTIZ

ELABORADA BAJO LA SUPERVISIÓN DEL COMITÉ DE ASESORÍA Y APROBADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN AGROECOLOGÍA

Aprobada por:

ASESOR PRINCIPAL:



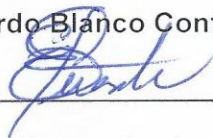
Dr. Jesús Vásquez Arroyo

ASESOR:



M.C. Eduardo Blanco Contreras

ASESOR:



M.C. Emilio Duarte Ayala

ASESOR:



M.C. Gerardo Zapata Sifuentes



M.C. Víctor Martínez Cueto



COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

DICIEMBRE DE 2017

AGRADECIMIENTOS

A DIOS. Por permitirme cumplir mis sueños con toda calma y sin problemas

A MI ALMA TERRA MATER. Por el privilegio de estudiar en esta institución con gran trayectoria en la preparación de profesionales

A MIS PROFESORES. Por el apoyo brindado durante estos años de estudio y como reconocimiento de gratitud por su labor de formación, que en mí hicieron un hombre de bien.

A MIS PADRES: A quienes la ilusión de su vida ha sido convertirme en una persona de provecho. Porque solo la superación de mis ideales me han permitido comprender cada día más la difícil posición de ser padres. Gracias enteramente por darme la herencia más valiosa que pudiera recibir fruto de inmenso apoyo y confianza que en mí se depositó, para que los esfuerzos y sacrificios hechos por mí no fueran en vano. Con amor y admiración su hijo.

DEDICATORIA

A MIS PADRES. Gabino Wenceslao y Ausencia Ortiz pues en ellos vi la fortaleza y el carácter que se necesita para alcanzar los logros

A MIS HERMANOS. Hugo, Jairo David y Ana Gabriela que siempre estuvieron ahí apoyándome a seguir con fuerza y me enseñaron que la vida está llena de sacrificios y decisiones, para tomar los caminos que te llevan a un buen futuro.

RESUMEN

El uso indiscriminado de fertilización de síntesis industrial, conlleva a un desbalance nutricional, todo esto debido al intenso laboreo de las tierras, al monocultivo buscando la cosecha con valor económico. Desde la década de los 70's, el estudio de rizobacterias promotores del crecimiento vegetal (RPCV) se investiga con gran impulso en países europeos, asiáticos y latinoamericanos, incluido México. El presente trabajo busca demostrar la acción de la bacteria nativa de la Región Lagunera Gram positiva *Bacillus megaterium* con potencial promotor de crecimiento vegetal, aumentando el porcentaje de germinación en el cultivo de maíz bajo condiciones de laboratorio. Se llevó a cabo un diseño experimental factorial A x B con cinco repeticiones, donde el factor A, correspondió a los genotipos (ABT 1126 y AGR) y B a las concentraciones bacterianas (25 y 50% de concentración bacteriana y el control). Se determinaron las variables: % de germinación, longitud (cm), tallo y raíz; peso fresco (g) y seco de tallo (g) y raíz (mg). De acuerdo con los análisis de varianza, existió diferencias altamente significativas para todas las variables respecto a los genotipos ($P > 0.001$), indicándonos la importancia que las variedades a utilizar y la respuestas dependerán del material genético de maíz a utilizar. Se encontraron diferencias de medias entre tratamientos para longitud de raíz, siendo mejor el tratamiento del 25% de inóculo bacteriano. No existieron diferencias de medias entre tratamientos, para la germinación Es necesario llevar a cabo mayores estudios probando una amplia gama de genotipo o variedades y experimentar con la bacteria encapsulada.

Palabras Claves. Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal, *Bacillus megaterium*, Biofertilizante, Germinación, *Zea mays*.

INDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA.....	ii
CONTENIDO.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
I.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 OBJETIVO.....	2
1.2 HIPOTESIS.....	2
II.- REVISIÓN DE LITERATURA.....	1
2.1 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR):.....	1
2.2 Función de las PGPR para incrementar el crecimiento vegetal.	1
2.2.1 Tolerancia al estrés abiótico de las plantas.....	1
2.2.2 Disponibilidad de nutrientes para la entrada de la planta.....	2
2.2.3 Reguladores de crecimiento vegetal.....	3
2.2.4 Producción de hormonas.....	3
2.2.5 Producción de Sideroforos.....	3
2.2.6 Producción de compuestos orgánicos volátiles.....	4
2.2.7 Producción de enzimas.....	4
2.2.8 Beneficios y perjuicios de las PGPR.....	4
2.2.9 Función de las PGPR como biofertilizante.....	5
2.3 Mecanismos involucrados en la colonización de semillas.....	6
2.3.1 Especificidad del hospedero en la aplicación de la PGPR.....	8
2.3.2 Bioiniciación (Biopriming).....	9
2.3.3 Bioiniciación y productividad de los cultivos.....	10
2.3.4 Función de la bioiniciación en la resistencia contra el estrés abiótico.....	11
2.3.5 Función de la bioiniciación en la resistencia contra el estrés biótico.....	11
2.3.6 Economía de la bioiniciación.....	13
2.4 los géneros bacterianos.....	14
2.4.1 Aislamiento.....	14

2.4.2 Identificación.....	15
2.4.3 Colonización de la raíz.	15
2.4.4 Asociación planta-bacteria.	16
2.4.5 Mecanismos promotores de crecimiento vegetal.	17
2.4.6 Producción de ácido indol-acético	17
2.5 Efectos de la inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal.	18
III.- MATERIALES Y METODOS.....	19
3.1 Ubicación del experimento.....	19
3.2 Material biológico.	19
3.2.1 Caracterización de <i>Bacillus megaterium</i>	20
3.2.2 Desinfección e inoculación de las semillas.....	22
3.3 Efecto de <i>Bacillus megaterium</i> con potencial promotor del crecimiento en la germinación de semillas de maíz (<i>Zea mays</i>).....	22
3.3.1 Porcentaje de inoculación.	23
3.3.2 Peso seco de tallo.	23
3.3.3 Peso seco de la raíz.	23
3.4 Diseño experimental.	23
3.5 Análisis de datos.	24
IV.-RESULTADOS.....	25
4.1 Caracterización de <i>Bacillus megaterium</i>	25
4.2 Evaluación del efecto de <i>B. megaterium</i> sobre las variables (% de inoculación, Peso seco de tallos, Peso seco de la raíces).....	25
4.3 Diseño experimental –Análisis.....	28
V.- DISCUSIÓN.....	29
VI.-CONCLUSIONES.....	29
VII.- REFERENCIAS.....	30

ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Resultados de ANOVA para la inoculación de genotipos de maíz con <i>B. megaterium</i>	28
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1 : Determinación espectrofotométrica del crecimiento microbiano de <i>B. megaterium</i> ...	21
Figura 2: Caracterización de <i>Bacillus megaterium</i> , es una bacteria Gram-positiva figura a) en forma de cadena (Amornrat, 2009) y de forma cilíndrica figura b) resultado obtenidos en este trabajo.	25
Figura 3. Resultados de crecimiento de tallo y raíz (cm) y germinación (%) de los diferentes tratamientos experimentales.....	26
Figura 4. Resultados del peso fresco en relación al peso seco de raíz y tallos de los diferentes tratamientos experimentales.....	27
Figura 5. Genotipo AGR., a) Plantas inoculadas con un 25% de la cepa <i>B. megaterium</i> ., b) Plantas inoculadas al 50% con <i>B. megaterium</i> y c) control.....	27
Figura 6: Genotipo ABT 1126, d) inoculado con <i>B. megaterium</i> con una concentración al 25%, e) con una concentracion al 50%, y f) como control.	28

I.-INTRODUCCIÓN

El sistema de producción agrícola, actualmente se encuentra inmerso en un ciclo vicioso interminable, que inicia con la pérdida de materia orgánica y la microbiología del suelo, provocando que el mismo pierda su estructura y disminuya su porosidad con la consecuente reducción del intercambio de gases, retención de humedad y baja eficiencia de uso de nutrientes por la planta. El uso indiscriminado de fertilización química conlleva a un desbalance nutricional, todo esto debido al intenso laboreo de las tierras, al monocultivo y la búsqueda de la cosecha con valor económico (Cortés-Jiménez et al., 2009). Los fertilizantes químicos son una fuente de contaminación del suelo y aguas subterráneas, si no se utilizan de forma balanceada; es por ello que desde hace algunas décadas se trabaja buscando alternativas ecológicas de fertilización en las plantas, para preservar el ambiente (Noda, 2009). Desde la década de los 70's, el estudio de rizobacterias promotores del crecimiento vegetal se investiga con gran impulso en países europeos, asiáticos y latinoamericanos, incluido México (Hernández-Flores et al., 2012),

Destacándose aquellos microorganismos capaces de llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno. El uso de rizobacterias promotores de crecimiento vegetal en la agricultura se denomina biofertilización. Es considerada una biotecnología que contribuye al desarrollo sostenible ya que favorece el desarrollo de los cultivos agrícolas, beneficia al productor y se ha descrito como ambientalmente segura, económicamente viable y socialmente aceptable (Hernández-Flores et al., 2012). La inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal, contribuye al desarrollo y producción de cultivos tales como arroz, trigo, maíz caña de azúcar, hortalizas y sorgo (Bécquer et al., 2008).

Es preciso conocer los microorganismos presentes en la rizosfera para así favorecer la interacción planta- bacteria, de una forma conjunta tomando en cuenta todas las interacciones de un ecosistema. En la actualidad, la producción de cultivos requiere de un enfoque sostenible que considere la productividad y la rentabilidad de los sistemas de producción, así como la conservación de los recursos naturales. De hecho, la utilización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal es una alternativa que promueve la fertilización, la germinación y es una estrategia que puede ser punto de partida hacia la

solución parcial de problemas agrícolas. En este sentido el objetivo del presente trabajo fue evaluar la acción de *Bacillus megaterium* con potencial promotor de crecimiento, aumentando el porcentaje de germinación en el cultivo de maíz bajo condiciones de laboratorio.

1.1 OBJETIVO

Evaluar el potencial de *B. megaterium* como bacteria promotora de crecimiento vegetal utilizando como modelo el maíz (*Zea mays* L.)

1.2 HIPOTESIS

Las plantas inoculadas con *B. megaterium* presentaran mayor porcentaje de germinación, mayor peso seco de raíz y de tallo que de plantas no inoculadas.

II.- REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR):

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal poseen varios mecanismos que estimulan el desarrollo de las plantas, mecanismos que involucran la producción de sustancias que actúan directamente sobre las células vegetales y provocan un aumento en el desarrollo de las mismas. También estas bacterias tienen influencia y gran participación en el ciclaje de nutrientes como nitrógeno y fósforo, son capaces de tomar formas no disponibles para la planta y transformarlas, hasta la obtención de formas asimilativas para las células vegetales (Camelo *et al.*, 2011).

Las PGPR colonizan las raíces de las plantas y ejercen efectos beneficiosos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas mediante una amplia variedad de mecanismos. Para ser un PGPR eficaz, las bacterias deben ser capaces de colonizar el entorno de las raíces porque necesitan establecerse en la rizosfera a densidades de población suficientes para producir los efectos beneficiosos (Glick *et al.*, 1995).

2.2 Función de las PGPR para incrementar el crecimiento vegetal.

De forma individual y en mezclas las PGPR, aportan beneficios importantes para las plantas, como la estimulación del crecimiento y la supresión de enfermedades, bien sea por el aporte de agua y de nutrimentos o en la solubilización de compuestos orgánicos y la producción de metabolitos secundarios, que actúan de forma análoga a las fitohormonas, por lo cual, influyen directamente en la disponibilidad de nutrientes y en la estimulación del crecimiento vegetal. Se puede indicar que manejan diversos tipos, modos y mecanismos de acción, relacionados con la competencia por espacio y por nutrientes; el parasitismo y la producción de compuestos antimicrobianos, que regulan y modifican la composición de la comunidad microbiana del suelo (Cano, 2011)

2.2.1 Tolerancia al estrés abiótico de las plantas.

En las plantas bajo condiciones de estrés abiótico se ven afectados los parámetros morfo-fisiológicos, la producción de hormonas y pigmentos fotosintéticos (Garbero *et al.*, 2011).

El etileno es una sustancia que participa en la regulación de la respuesta de las plantas frente al estrés abiótico. Estos reguladores del crecimiento vegetal pueden interactuar de forma cooperada o antagónica, dependiendo del factor estresante. La selección de la respuesta más adecuada a cada uno de estos estímulos está determinada en parte por la interacción, positiva o negativa, que se establece entre estos fitorreguladores (Chávez *et al.*, 2012).

Los organismos pueden incrementar sus tasas de crecimiento llegando a alcanzar tallas idénticas a organismos no sometidos a estrés; este proceso se denomina crecimiento compensatorio, las plantas presentan peculiaridades morfológicas y fisiológicas que las hacen capaces de mantener crecimiento, incluso en presencia del factor que provoca el estrés (Retuerto *et al.*, 2003).

2.2.2 Disponibilidad de nutrientes para la entrada de la planta

El suelo contiene numerosos géneros de bacterias, muchos de los cuales no solo tienen un papel importante en el ciclo de nutrientes, sino que también protegen los cultivos contra las enfermedades. En el crecimiento y desarrollo de las plantas es importante describir adecuadamente las interacciones microbianas. La capacidad de producir múltiples clases de antibióticos por *Bacillus spp.* Y *P. fluorescent*, probablemente ayude a suprimir diversos competidores microbianos. La seguridad y eficacia de los inoculantes estará determinada en gran parte por el éxito ecológico de las cepas aplicadas en los entornos en los que se introducen. El área de la superficie de la raíz para la captación de nutrientes y la producción de PGPR puede ayudar a optimizar el ciclo de nutrientes en caso de tensiones debidas a condiciones climáticas o de suelo inadecuadas. (Choudhary *et al.*, 2011).

2.2.3 Reguladores de crecimiento vegetal

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) benefician el crecimiento y desarrollo de las plantas directa e indirectamente a través de varios mecanismos. La producción de metabolitos secundarios cambiando la morfología de la raíz dando como resultado un mayor área superficial de la raíz para la absorción de nutrientes, producción de sideróforos, Acido indol-acetico, Antagonismo a patógenos de raíz transmitidos por el suelo, solubilización de fosfatos y fijación de nitrógeno. Los géneros de bacterias en la inoculación de plantas con potencial promotor son *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, etc. (Hayat *et al.*, 2010).

2.2.4 Producción de hormonas.

Bacillus megaterium estimula el crecimiento en plantas de tipo silvestre. Siendo así la inoculación de la raíz con PGPR hacen posible la correlación entre la acumulación de etileno manteniendo bajos niveles de producción de esta sustancia que acelera la maduración (Porcel *et al.*, 2014).

La biosíntesis de ácido indol-acetico y citoquininas en plantas superiores aún no se conoce bien, y solo en el caso del etileno se ha identificado un receptor. Como es el caso del genoma de *arabidopsis*. Que la hormona interactúa con una cantidad de genes de esta, que participan en el metabolismo y transducción de señales. Los niveles de ácido indol-acético y citoquinina se han alterado en plantas transgénicas, principalmente con promotores expresados constitutivamente, estos referidos mediante la manipulación de PGPR específicos para poder lograr los niveles hormonales en ciertas células, órganos y tejidos (Kende *et al.*, 1997)

2.2.5 Producción de Sideroforos.

Los sideroforos son pequeñas moléculas orgánicas producidas por microorganismos bajo condiciones limitantes de hierro que incrementan su entrada a la célula microbiana (Saha *et al.*, 2016).

Las plantas han desarrollado diferentes tipos de interacciones bióticas con las Poblaciones microbianas del suelo, la interacción planta-PGPR juega un papel importante al mejorar el crecimiento y la salud de diversas plantas. Además, ha ayudado a comprender las características claves con respecto a los modos de acción y la ecología de las interacciones planta-PGPR. Las hormonas vegetales regulan genes para la biosíntesis de otras vías hormonales. En consecuencia, es posible que PGPR pueda afectar estas conversaciones cruzadas (Vacheron et al., 2013).

2.2.6 Producción de compuestos orgánicos volátiles.

Es posible que el mecanismo por el cual actúan las PGPR sea la producción de compuestos orgánicos volátiles, promoviendo el crecimiento a través de la expansión celular, división celular y la interacción del 2,3-butanodiol con las hormonas de crecimiento vegetal establecidas. Desde la perspectiva de toda la planta. Es posible que los compuestos volátiles producidos por las raíces colonizadoras se generen a concentraciones suficientes para desencadenar las respuestas de la planta, con la baja presión parcial de Oxígeno en el entorno de la raíz (Ryu et al., 2003).

2.2.7 Producción de enzimas.

Se han llevado a cabo estudios sobre la resistencia a los antibióticos desarrollados en la inoculación de las semillas y la colonización de las raíces. Las PGPR demuestran resistencia a estreptomycin y a tetraciclina mostrando efectos promotores del crecimiento vegetal. La promoción de crecimiento provista por estas cepas incluye un mejor desarrollo de raíz y una mejor nodulación, lo que aporta una mejor capacidad de absorción de nutrientes y la supresión de patógenos (Kumara *et al.*, 2010).

2.2.8 Beneficios y perjuicios de las PGPR.

El uso de inoculantes de PGPR para mejorar la producción agrícola se ha demostrado en numerosos estudios y los mecanismos básicos ahora se comprenden bien. PGPR, de acuerdo con su modo de acción, puede clasificarse como biofertilizantes,

fitoestimuladores y bioplaguicidas, con ciertas bacterias que tienen aplicaciones superpuestas. En esto cada vez es más evidente que la mayoría de PGPR puede promover el crecimiento de las plantas por varios mecanismos, las estrategias para seleccionar las mejores cepas requiere un conocimiento más completo de los rasgos requeridos para la competencia de la rizosfera, y estudios sobre la ecología de la PGPR introducida con la misma, residente y otras especies microbianas en la rizosfera de la planta. El uso de inoculantes bacterianos en la agricultura ofrece muchas oportunidades para mejorar la nutrición de las plantas, el rendimiento de los cultivos y el manejo de enfermedades, al tiempo que mejora la sostenibilidad al reducir la necesidad de insumos químicos. (Martínez-Viveros *et al.*, 2010). Dentro de este continuo de interacciones, el rol planta-PGPR juega un papel importante al mejorar el crecimiento y la salud de plantas ampliamente diversas (Vacheron *et al.*, 2013).

El aumento de la producción de cianuro (HCN) no se origina necesariamente en el aumento de los productores de este. Es más probable que se deba a una alteración en el metabolismo secundario de las *Pseudomonas* productoras de HCN potenciales, que conducen desde una producción de HCN nula o pequeña a una producción de HCN. Tal cambio podría ser causado por la acumulación de sustancias desconocidas en suelos. Tales sustancias actúan como precursores del cianuro, o aumentan la disponibilidad de Fe²⁺ y por lo tanto la producción de HCN. *Pseudomonas* saprófitas pueden restringir el crecimiento de las plantas y sobre cómo este daño puede mitigarse mediante competencia mediada por sideróforos para Fe²⁺ (Bakker *et al.*, 1986).

2.2.9 Función de las PGPR como biofertilizante.

La aplicación de biofertilizantes debe ser considerada en el marco del sistema agrícola en el que se encuentra aplicado, favoreciendo interacciones sinérgicas con diferentes prácticas agronómicas que afectan las condiciones físicas y químicas del suelo (como pH, disponibilidad de agua, salinidad, contenido de materia orgánica) como labranza mínima o agricultura de precisión, control de irrigaciones y plagas. El diseño de programas de biofertilización mediante el suministro de diferentes consorcios, cada uno

con características nutritivas específicas más adecuadas para las diferentes fases fenológicas del cultivo, de forma similar a lo que se hace actualmente con los fertilizantes químicos (Malusá et al., 2014).

Las situaciones prácticas en las que PGPR tienen un impacto significativo en la restauración o el mantenimiento de la salud del suelo y la fertilidad. Aunque probablemente representen la simbiosis planta-bacteria más significativa, las bacterias relacionadas son solo una faceta de la interacción microbiana compleja que ocurre en la rizosfera (Jeffries et al., 2003).

La mejora en el uso de PGPR es una de las opciones emergentes para enfrentar los desafíos agrícolas impuestos por la demanda de alimentos en crecimiento. Además, esta biotecnología también es probable que garantice la conservación de nuestros entornos. La biotecnología brinda una excelente oportunidad para desarrollar biofertilizantes amigables con el medio ambiente que se utilizarán como suplementos y / o alternativas a los fertilizantes químicos (Khan et al., 2009).

El contacto a largo plazo de una población microbiana específica con un cultivo puede "refinar" aún más su capacidad de colonizar e interactuar con ese cultivo. Resultados muestran un efecto importante del genotipo del cultivo huésped como un modulador de la colonización de la rizosfera y la competitividad de las cepas de *P. fluorescens*. Esto indica que las especies de plantas tienen un efecto pronunciado en el resultado de la competencia entre las rizobacterias que pertenecen a la misma subespecie y que comparten un rasgo de control biológico similar (De la Fuente et al., 2006).

2.3 Mecanismos involucrados en la colonización de semillas.

Muchas bacterias asociadas a plantas son bien conocidas por su capacidad para conferir promoción del crecimiento vegetal y para aumentar la resistencia a diversas enfermedades, así como a los estreses abióticos. A menudo no confieren estos efectos beneficiosos cuando se aplican en el campo, lo que se debe a una colonización

insuficiente en la rizo y / o endosfera. Una mejor comprensión de cómo las bacterias beneficiosas colonizan los diferentes nichos de las plantas no solo dará como resultado un mayor conocimiento sobre las interacciones planta-bacteria sino que también conducirá a un uso más exitoso y confiable de los inoculantes bacterianos (Compant *et al.*, 2010).

Las cepas de bacterias endofíticas destinadas para su uso en fitorremediaciones son aquellas que colonizan el xilema y los espacios intercelulares. Esto se debe a que la mayoría de los contaminantes se translocan en el sistema vascular de las plantas, por lo tanto, para ser eficientes, las bacterias deben ser capaces de colonizar el sistema vascular de la planta, lo que hace que el proceso de fitorremediación microbiana sea más seguro que cuando lo hacen las plantas (Bacon *et al.*, 2006).

Trabajos anteriores demuestran que la inoculación de semillas con *Azotobacter* causa efecto en la población micribial de la endorizosfera, aunque en algunos casos el control inoculado carecía de microflora. Esto indica la presencia de una microflora inherente en la planta que puede potenciarse mediante el manejo de bacterias artificiales. La colonización en las plantas es a través de diversos mecanismos (Agarwhal *et al.*, 1987). Es así que, las bacterias después de la aplicación en el suelo tienden a colonizar la rizosfera y sobre el patrón de colonización en un espacio temporal y el estado fisiológico a lo largo de la raíz (Gamalero *et al.*, 2003).

Las interacciones que ocurren en la rizosfera y el papel de los exudados de las raíces en la mediación de algunos de estos procesos, la translocación de fotosíntesis a las raíces desde la escala molecular hasta la escala del ecosistema potencialmente conducirá al desarrollo de mejores plantas capaces de absorber más nutrientes, desintoxicando los suelos de manera más eficiente o protegiendo más eficazmente las malezas invasoras y los microbios patógenos (Bais *et al.*, 2006).

Estos exudados incluyen diversos tipos de ácidos orgánicos, aminoácidos y carbohidratos que sirven como alimento para la mayoría de las bacterias que habitan en

la rizosfera, lo que explica porque la secreción constante y diversa de exudados de raíz (Walker *et al.*, 2003).

Las bacterias específicas del suelo llamadas rizobios forman nódulos que han evolucionado ciertos procesos de entrada como la introducción a través de la corteza y las fisuras radiculares laterales y las grietas intercelulares formando órganos especializados llamados nódulos al penetrar en las raíces a través de la utilización de flavonoides y genes “nod” de dichas bacterias (Garg *et al.*, 2007).

Las rizobacterias que tienen múltiples actividades dirigidas a la promoción del crecimiento vegetal exhiben potenciales de biorremediación desintoxicando contaminantes como metales pesados, pesticidas y controlan una variedad de fitopatógenos como bioplaguicidas, en esto las PGPR han mostrado resultados espectaculares en diferentes estudios de cultivos. La eficiencia productiva específica puede mejorarse aún más con la optimización y la aclimatación de acuerdo con las condiciones del suelo prevalecientes. La comprensión de los mecanismos de la fitoestimulación mediada por PGPR allanaría el camino para encontrar cepas de rizobacterias más competentes que puedan funcionar en diversas condiciones agroecológicas (Ahemad *et al.*, 2014).

2.3.1 Especificidad del hospedero en la aplicación de la PGPR.

La especificidad del hospedador depende de cepas bacterianas particulares a rasgos no específicos de plantas hospedadoras o cepas bacterianas no específicas a características particulares de las plantas hospedadoras, sugiriendo que los procesos evolutivos han conducido a una interacción preferencial entre una cepa y su cultivar hospedante original (Droque *et al.*, 2013).

En otros estudios, sugieren fuertemente que las características de quimiotaxígeno probablemente favorecen a los endófitos y podrían inducir la exclusión de otros microorganismos colonizadores del nicho ecológico (Bacilio-Jiménez *et al.*, 2003).La

composición genética de las plantas es importante para determinar las asociaciones de microbiomas con las raíces y la rizosfera (Bulgarelli *et al.*, 2015).

En un estudio detallado sobre el estudio del genoma completo en *Arabidopsis*, para la capacidad de respuesta a la actividad promotora del crecimiento vegetal de la rizosfera mostró que la capacidad de las plantas de beneficiarse de sus microbios asociados a la raíz tiene un claro componente genético. Por lo tanto, la identificación de genes y loci relacionados con la respuesta de PGPR en especies de cultivos económicamente relevantes (Wintermans *et al.*, 2016).

Los estudios sobre la especificidad del hospedador y la presencia microbiana en las raíces de las plantas se han facilitado mediante el uso de técnicas de secuenciación de próxima generación en los últimos años, el establecimiento y las funciones de la comunidad bacteriana en condiciones de laboratorio (Bai *et al.*, 2015).

Es interesante que gran parte de los efectos beneficiosos de la PGPR como biofertilizante puedan venir de influencias en la regulación del crecimiento de las plantas, cambios en la arquitectura de raíces y asimilación de patrones de partición, y No es que las bacterias estén proporcionando un mayor suministro de nutrientes a la planta huésped. Si las acciones bacterianas pueden dar como resultado una mejor morfología de la raíz para la absorción de nutrientes" para competir y colonizar la rizosfera y las raíces (Vessey, 2003).

2.3.2 Bioiniciación (Biopriming).

Bioiniciación o bioinmersión (Tratamientos combinados entre la preparación de la semilla y el recubrimiento de la semilla con agentes de control biológico) Los tratamientos de semillas con bioinmersión pueden proporcionar un alto nivel de protección contra las enfermedades de pudrición de la raíz de las plantas de cultivo. Esta protección era generalmente igual o superior al control proporcionado con el tratamiento de fungicidas. Por lo tanto, se podría sugerir que la bioinmersión se puede usar comercialmente como

sustituta de los tratamientos tradicionales de semillas de fungicidas para controlar los patógenos de las plantas y del suelo. Además, la bioinmersión también mejora la germinación de la semilla, el establecimiento de plántulas y el crecimiento vegetativo (Reddy, 2013).

El uso de metabolitos secundarios de plantas para estimular la degradación microbiana de contaminantes ofrece la oportunidad de desarrollar sistemas sostenibles para sitios que son particularmente vulnerables a eventos de contaminación regulares. Al introducir plantas en el sitio que producen naturalmente metabolitos secundarios apropiados, se puede establecer una barrera económica y de fácil disponibilidad para la protección del sitio a largo plazo. Las endófitas se pueden aislar a partir de plantas huéspedes de interés y genéticamente potenciadas con genes que codifican enzimas de degradación de interés antes de la inoculación para la biorremediación (Anitha *et al.*, 2013).

El presente estudio sugiere que la bioinmersión con *P. fluorescens* mejora la capacidad de las semillas de girasol para vigorizar y que las plántulas crezcan de manera uniforme. Se puede concluir que los microorganismos tienen el potencial de proliferar, colonizar y producir crecimiento vegetal durante los procedimientos de bioinmersión esta tecnología puede ser de interés y de valor para los productores que desean evitar los fertilizantes químicos de sus cultivos (Moeinzadeh *et al.*, 2010).

2.3.3 Bioiniciación y productividad de los cultivos.

La inoculación de Bacterias fijadoras de fosforo y / o Bacterias solubilizadoras de fosforo sin fertilizante químico no suele ser efectiva, parece que la adición de biofertilizantes y el bajo aporte de fertilizantes químicos daría resultados prometedores. Con un enfoque se podría reducir la sobre aplicación de fertilizantes fosforados para el beneficio de los agricultores y garantizar prácticas amigables con el medio ambiente (Saber *et al.*, 2012). En otras revisiones los resultados sugieren que el cribado simultáneo de rizobacterias para el crecimiento y la promoción del rendimiento en un experimento de campo es una

buena herramienta para seleccionar el PGPR eficaz para la biotecnología del desarrollo de biofertilizantes (Gholami *et al.*, 2009).

Al utilizar la técnica bioinmersión con un biofertilizante comercial que tiene diferentes especies bacterianas incluyendo *Bacillus lentus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida* y *Azospirillum spp.* Observaron un aumento en varios rasgos agro morfológicos de las plantas de trigo. El peso fresco del tallo y de la plántula total se incrementó con el inoculado de PGPR en plántulas de maíz en un experimento de laboratorio (Gholami *et al.*, 2009).

2.3.4 Función de la bioiniciación en la resistencia contra el estrés abiótico

El papel del bioinmersión en la tolerancia al estrés por salinidad ha sido ampliamente estudiado y se han registrado resultados prometedores. El género más notable utilizado en la tolerancia al estrés abiótico es *Bacillus*, que se utiliza en la papa (Gururani *et al.*, 2012).

En estudios han establecido que *Bacillus cereus*, aislado de la rizosfera de una halófito facultativa, no solo era tolerante a la sal, sino que también tenía atributos de promoción del crecimiento vegetal, que se demostró por primera vez *in vitro*. Al determinar su mecanismo de acción, se descubrió que inducía la promoción del crecimiento vegetal y la tolerancia al estrés salino a través de una serie de mecanismos, algunos de los cuales tales como la solubilización del fosfato, mientras que la mayoría eran inducidos en el testigo. El uso de tales microorganismos que pueden inducir tolerancia al estrés abiótico en el huésped como biofertilizantes puede ser una gran ayuda para la agricultura ya que la urbanización y la industrialización están agotando rápidamente nuestras tierras cultivables (Chakraborty *et al.*, 2011).

2.3.5 Función de la bioiniciación en la resistencia contra el estrés biótico.

En trabajos documentados, fue posible aplicar las células de *Serratia plymuthica* y *P. chlororaphis* a los diferentes cultivares de colza para el control de un patógeno *V.*

longisporum causante de la enfermedad de Blackleg, y se observó que la extensión de la enfermedad se redujo hasta un 71,6% por *S. plymuthica* y un 54% por *P. chlororaphis*. La bioinmersión de semillas dio el mayor control sobre *V. longisporum*. Que la granulación y el recubrimiento de la película no son factibles para la aplicación de *S. plymuthica* a las semillas (Muller *et al.*, 2008).

Una respuesta que se produjo sin el aumento del crecimiento de las plántulas inducido por *Trichoderma*. Las semillas cubiertas con *T. harzianum*, *T. viride* se pueden almacenar durante 4 semanas con la viabilidad de *Trichoderma* permaneciendo bastante estable (Pill *et al.*, 2009).

Resultados proporcionan la evidencia de actividad de un agente de control biológico *P. fluorescens* a través de bioinmersión de semillas y observaron que la incidencia de plagas de *Alternaria* se redujo y la bioinmersión ayudó a las plantas a tolerar la incidencia de la enfermedad de manera eficiente. En maíz, se aplicó el agente de control biológico *Trichoderma harzianum*, que resultó en un mejor control de *F. verticillioides* y *fumonisin* y puede utilizarse como una alternativa a los fungicidas para controlar los mohos toxigénicos (Nayaka *et al.*, 2010).

Los microbios capaces de colonizar la rizosfera y las raíces de las plantas pueden proteger las plantas de patógenos mediante la interacción antagónica (Berg *et al.*, 2001).

Durante la germinación de la semilla, la colonización microbiana antagónica exitosa ayuda a reducir el ataque patogénico en la planta. La supresión de la técnica que lleva a una disminución total en el campo probablemente sea el resultado de un continuo de actividad supresiva por parte de las bacterias a lo largo de la historia de vida saprófita y parasítica del hongo (Weller, 1983).

En estudios, se demuestra que la bioinmersión con la cepa de biocontrol *Canavalia rosea* hace posible sembrar semillas infectadas con *Alternaria spp.* Patógena. Sin riesgo de efectos adversos en el establecimiento de plántulas. Esto es particularmente interesante

para los agricultores orgánicos porque es difícil producir semillas orgánicas libres de enfermedades de alta calidad (Jensen *et al.*, 2004).

La combinación entre la inoculación de semillas y los agentes de control biológico ha mejorado la tasa de germinación y la aparición uniforme de cultivos de hortalizas y la reducción de la incidencia de la pudrición y la pudrición de la raíz. La modificación del suelo con la formulación de *T. harzianum* en la bioinmersión de semillas de caupí, causaron una gran disminución en la incidencia de la pudrición de la raíz, aumentaron el rendimiento de las vainas frescas y mejoraron la persistencia de *Trichoderma* propágulos en suelo de rizosfera de las plantas de caupí. Tales tratamientos de suelo y semilla representan una estrategia ambientalmente ecológica para controlar los patógenos del suelo y de la raíz como sustituto de los fungicidas químicos (El-Mohamedy *et al.*, 2006).

La técnica evaluada en el presente estudio podría recomendarse a la luz de los resultados obtenidos. El uso de semillas de bioinmersión podría considerarse un método de biocontrol seguro, barato y de fácil aplicación que se utilizará contra los patógenos de las plantas en el suelo, en particular para los agricultores orgánicos, para evitar la contaminación ambiental (El-Mougy *et al.*, 2008).

2.3.6 Economía de la bioiniciación.

Varios trabajadores han fomentado que esta técnica sea un enfoque rentable para el control biológico de diferentes microorganismos patógenos y la aplicación de bacterias beneficiosas al suelo. Junto con la productividad del cultivo, también se puede favorecer la bioinmersión como la técnica potencial para el control biológico de varios patógenos de plantas. El control de estos patógenos de plantas generalmente se lleva a cabo mediante el uso de plaguicidas costosos en los que podemos promover esta técnica como tecnología de doble propósito que mejora la productividad de la planta y la resistencia al estrés una al lado de la otra (Mahmood *et al.*, 2016).

2.4 los géneros bacterianos.

La promoción directa de PGPR implica proporcionar a la planta sustancias promotoras del crecimiento vegetal que son sintetizadas por las bacterias que facilitan la absorción de ciertos nutrientes de las plantas del medio ambiente. Los géneros de bacterias que han sido reportadas como PGPR: *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcous*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Serratia* (Saharan *et al.*, 2011).

El *Bacillus* es el género más abundante en la rizosfera, y la actividad de PGPR de algunas de estas cepas se conoce desde hace muchos años, lo que da como resultado un amplio conocimiento de los mecanismos implicados. Hay una serie de metabolitos que son liberados por estas cepas que afectan fuertemente el medio ambiente al aumentar la disponibilidad de nutrientes de las plantas (Barriuso *et al.*, 2008).

Bacillus megaterium es una bacteria gram positiva, principalmente aeróbica que produce esporas y que se encuentra en hábitats muy diversos, desde el suelo hasta el agua de mar, los sedimentos, los arrozales, la miel, los peces y los alimentos desecados. (Martin *et al.*, 1995).

2.4.1 Aislamiento

Los géneros *bacillus* Presentan características como las endosporas que le confiere resistencia a la desecación y al calor, es por ello que es un candidato ideal para formular productos estables y su utilización en la Biotecnología Agrícola. Teniendo en cuenta estos antecedentes y la importancia de contar con cepas que presenten estas potencialidades para ser utilizadas posteriormente en la Agrobiotecnología. El aislamiento de bacterias a partir de muestras naturales se realiza, en la mayoría de los casos, mediante la técnica de estría cruzada para producir para producir colonias aisladas en cultivos sólidos y así, obtener un cultivo puro. Cuando la técnica por estría se aplica para aislar un microorganismo de interés a partir de mezclas donde se

encuentra en pequeñas cantidades, generalmente se obtendrán las bacterias dominantes. En este caso, se utilizan medios selectivos o de enriquecimiento, los que contienen nutrientes especiales, antibióticos, altas concentraciones de sales y/o condiciones de pH, luz o temperatura que incrementarán la población de microorganismos de interés y así facilita su aislamiento (Aquiahuatl *et al.*, 2012)

2.4.2 Identificación.

En trabajos relacionados con la identificación de géneros bacterianos se toma 0,1 mL de dilución tratada y se siembra con asa estéril en placas con medio agar nutritivo e incubadas durante 72 h a 28°C para después realizarles el conteo de las colonias de distinta apariencia. Se toma una muestra representativa de cada colonia para realizarle una tinción Gram con violeta cristal y se observa al microscopio con un aumento de 100 X. Aquellas colonias que muestran presencia de endospora bacteriana pasaron a una subcultivación en agar nutritivo durante 24 h a 28°C para efectuar la prueba de la catalasa a fin de ubicarlas en el género *Bacillus*. Los aislamientos que resulten positivos a la catalasa se conservan en frascos de agar nutritivo a 4°C hasta su posterior uso (Reinoso *et al.*, 2006).

2.4.3 Colonización de la raíz.

La colonización de raíces es un paso esencial en el control biológico de patógenos y en la mejora del crecimiento de las plantas mediante PGPR. Los elementos fundamentales para una colonización eficiente incluyen la capacidad de los microorganismos para sobrevivir después de la inoculación, para crecer en la esfermósfera (región que lo rodea) en respuesta a la producción de exudados por semilla, fijar en la superficie de las primeras raíces y colonizar todo el sistema radicular (Nelson, 2004).

Estos pasos están influenciados por factores bióticos y abióticos. De hecho, la colonización de las semillas es el primer paso en el proceso de colonización de la raíz. Los microorganismos que se establecen en las semillas durante la germinación pueden crecer y colonizar las raíces a lo largo de su longitud desde donde emergen y crecen en

el suelo. La colonización de semillas durante la fase de remojo tiene un efecto significativo sobre el crecimiento de la planta. A través de la utilización de marcadores, (Trivedi *et al.*, 2005)

En otros estudios indicaron que la cepa nativa de *B. megaterium* debido a sus diversas capacidades de promoción del crecimiento de las plantas tales como la solubilización de fosfato, la producción de IAA y el biocontrol se puede desarrollar como inoculante microbiano potencial para su uso en condiciones climáticas templadas (Trivedi *et al.*, 2008).

2.4.4 Asociación planta-bacteria.

La inoculación de plantas con *Bacillus megaterium* puede provocar cambios significativos en varios parámetros de su crecimiento, los cuales pueden afectar o no el rendimiento del cultivo. Esta bacteria benéfica, general y no específica es notoria por sus efectos sobre plantas comerciales (Dosreis, 2000).

La fijación de nutrientes del suelo está dado por el crecimiento radical y su interacción con los componentes bióticos y abióticos del suelo. Esta interacción se manifiesta en gran medida por las propiedades Físicas, químicas y biológicas de la rizósfera. A partir de un mejor conocimiento de las interacciones de la rizósfera y de cómo se asocian las raíces con los microorganismos del suelo habrá oportunidad para mejorar la eficiencia de la captación de nutrientes por las plantas. Esto podrá ocurrir ya sea por selección directa de plantas, manipulación del crecimiento radical o mediante el manejo de las comunidades microbianas autóctonas y/o inoculaciones específicas para lograr interacciones simbióticas y asociativas eficientes. Tales interacciones han demostrado su contribución al crecimiento de las plantas y a la calidad de los suelos, que constituyen aspectos críticos en el desarrollo de una agricultura sostenible y buen funcionamiento del ecosistema (Pedraza *et al.*, 2010).

2.4.5 Mecanismos promotores de crecimiento vegetal.

Las bacterias asociadas a la rizósfera de las plantas tienen la capacidad de generar mecanismos que afectan positivamente su crecimiento y desarrollo; capacidad que no ha sido estudiada completamente y difiere de un microorganismo a otro (Sarabia *et al.*, 2010).

PGPR puede usar varios mecanismos para estimular el crecimiento y desarrollo de las plantas, proteger las plantas de enfermedades transmitidas por el suelo y aumentar la tolerancia al estrés de las plantas. Estos mecanismos incluyen la producción de fitohormonas, metabolitos anti fúngicos y / o enzimas líticas, aumentar la disponibilidad de nutrientes vegetales, reducción en la producción de etileno inducida por estrés, e inducción de resistencia sistémica (Lugtenberg *et al.*, 2009).

2.4.6 Producción de ácido indol-acético

El ácido indol-acético (AIA), es una de las auxinas naturales más importantes y se ha demostrado que pueden ser sintetizadas por diferentes especies de bacterias, hongos y algas. Entre los más destacados encontramos bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Bacillus*, entre otros (Patten *et al.*, 1996).

IAA ha estado implicado en aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, así como en las respuestas de defensa. Esta diversidad de funciones se refleja en la extraordinaria complejidad de las vías de biosíntesis, transporte y señalización de IAA. Generalmente, IAA afecta la división y diferenciación de las células vegetales; estimula la germinación de semillas y tubérculos, aumenta la tasa de desarrollo de xilema y raíz, controla los procesos de crecimiento vegetativo; inicia la formación de raíz lateral y adventicia; media las respuestas a la luz, la gravedad y la fluorescencia; afecta la fotosíntesis, la formación de pigmentos, la biosíntesis de varios metabolitos y la resistencia a condiciones estresantes. IAA producido por rizobacterias probablemente interfiera en los procesos fisiológicos anteriores de las plantas al cambiar el conjunto de auxinas de la planta. Además, el IAA bacteriano aumenta el área y la longitud de la

superficie de la raíz y, por lo tanto, proporciona a la planta un mayor acceso a los nutrientes del suelo. Además, el IAA rizobacteriano afloja las paredes celulares de las plantas y, como resultado, facilita una cantidad creciente de exudación de raíces que proporciona nutrientes adicionales para apoyar el crecimiento de las bacterias de la rizosfera (Glick, 2012).

2.5 Efectos de la inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal.

Los aislamientos PGPR son capaces de aliviar el exceso de sales en las plantas, aumentar la germinación, la longitud de los tallos / raíces, la producción de materia seca y el rendimiento en diversas plantas agrícolas y hortícolas. Las PGPR pueden contribuir a resolver los problemas de producción de plantas causados por la alta salinidad. La elucidación de los mecanismos de alivio del estrés salino y la promoción del crecimiento vegetal mediante PGPR, como la estimulación del crecimiento de las raíces mediante la producción de fitohormonas, la disminución de los niveles de etileno por la enzima ACC deaminasa y la competencia por nutrientes y nichos ha proporcionado nuevas puertas a las estrategias que pueden mejorar la eficacia de los agentes de PGPR (Egarmberdieva *et a.*, 2014).

III.- MATERIALES Y METODOS

3.1 Ubicación del experimento.

El experimento se realizó en los laboratorio de los departamentos de Agroecología y Fitomejoramiento, de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, ubicada con coordenadas 24° 22' de Latitud Norte y 102° 22' de Longitud oeste con elevación a 1120 msnm.

3.2 Material biológico.

Se empleó la cepa de *Bacillus megaterium* la cual fue proporcionada y resguarda en el Laboratorio de Agroecología por la M.C. Eduviges Cisneros Valdez de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango, Unidad Gómez Palacio y genotipos de maíz proporcionados gentilmente por el Dr. Héctor Javier Martínez Agüero, Jefe del Departamento de Fitomejoramiento (ABT 1126) y (AGR).

Para la siembra del microorganismo, se utilizaron los siguientes medios de cultivo: Caldo nutritivo (CN). Es un medio líquido complejo de uso general para el cultivo de bacterias.

Ingredientes	(g/L)
Peptona de caseína	5.0
NaCl	8.0
Extracto de carne	3.0
pH	6.5-7.0

- a. Disolver cuidadosamente los ingredientes en el orden indicado y ajustar el pH.
- b. Distribuir en tubos de ensaye o matraces.
- c. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Agar nutritivo (AN). Es un medio sólido complejo de uso general para el cultivo de bacterias.

Ingredientes	(g/L)
Peptona de caseína	5.0
NaCl	8.0
Extracto de carne	3.0
Agar	15.0
pH	6.5-7.0

- Disolver cuidadosamente los ingredientes en el orden indicado y ajustar el pH.
- Calentar a ebullición durante 1 minuto.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

3.2.1 Caracterización de *Bacillus megaterium*.

La cepa de *B. megaterium* se creció en placas de agar nutritivo se incubaron a 28 ± 2 °C durante 48 h. Posteriormente se seleccionó la colonia y se sembró por estriado en caldo nutritivo poniéndolo en agitación por 24 h para obtener un cultivo puro de la cepa. Se realizó un frotis y llevó a cabo la tinción de Gram, con lo que se pudo constatar que es un bacilo Gram positivo (Figura 1), como se esperaba, se anotaron características de la colonia y realizaron pruebas bioquímica sencillas de catalasa, oxidasa, agar de lisina y hierro (LIA), movilidad, indol y ornitina (MIO) y triple azúcar y hierro (TSI). Un aislado puro se mandó a realizar pruebas bioquímicas y caracterización molecular a la Clínica de Medicina Familiar y Especialidad Quirúrgica del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), cita en Calle Mar No. 395. Col. Torreón Residencial. CP 27268. Torreón, Coahuila. Con la M.C. María Guadalupe Ernestina González Yáñez, quien gentilmente nos apoyó para la caracterización bioquímica y molecular del organismos en estudio.

3.2.1.1 Cinética de crecimiento.

Para la realización de la cinética de crecimiento se tomó en cuenta la metodología empleada por Díaz-Borrego et al. 2005 con algunas adecuaciones con lo propuesto por Pedroza et al. 2007.

Para determinar la cinética de crecimiento de *B. megaterium*, se procedió como sigue:

- En condiciones asépticas, inocular 10 mL del cultivo de *B. megaterium* (del matraz A) en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de caldo nutritivo (matraz B).
- Homogeneizar el cultivo agitando suavemente y tomar de inmediato, con pipeta estéril, 3 mL que se pasan a un tubo de ensaye estéril. Esta muestra corresponde al tiempo cero ($t=0$).
- Colocar el matraz B en un agitador orbital a una velocidad de 100 rpm, incubando a la temperatura correspondiente. De la misma forma, se tomarán muestras de 3 mL cada 30 min hasta completar 4 h de incubación.
- Leer la densidad óptica (D.O.) de cada muestra en un espectrofotómetro a 560 nm, previamente calibrado con medio de cultivo estéril. Cuando las muestras reporten una D.O. igual o mayor a 0.8, se prepararán diluciones con caldo de cultivo estéril. (Fd)

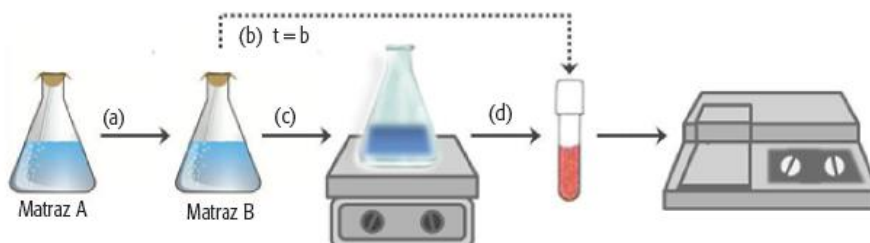


Figura 1 : Determinación espectrofotométrica del crecimiento microbiano de *B. megaterium*.

3.2.1.2 Preparación del inóculo bacteriano.

Para la producción del crecimiento de la bacteria se realizó en un matraz Erlenmeyer con 150 ml de caldo nutritivo donde se le agregó 1 ml de la bacteria. Las manipulaciones se efectuaron en la campana de flujo laminar y el matraz inoculado se llevó a agitación continua a 120 rpm y a temperatura ambiente por 24 ± 4 h o hasta observar turbidez evidente del medio. En condiciones asépticas se extrajeron 1 ml del inóculo para medir el crecimiento bacteriano por espectrofotómetro a una longitud de onda (λ) de 560nm y alcanzar una concentración final del inóculo de 10^8 UFC*mL⁻¹

3.2.2 Desinfección e inoculación de las semillas

Las semillas de maíz (*Zea mays*) se lavaron con agua corriente para eliminar los productos químicos de la certificación de las semillas y diez veces con agua destilada desionizada estéril para eliminar algunas impurezas de los mismos. Luego se desinfectaron con inmersión en etanol al 80% durante tres minutos y se lavaron 5 veces consecutivas con agua destilada desionizada estéril. Seguidamente, se le agregó hipoclorito de sodio al 5.25% por 15 minutos y se lavaron diez veces consecutivamente con agua destilada desionizada estéril; por último, se les dejó escurrir en condiciones de esterilidad en una cámara de flujo laminar.

Las semillas desinfectadas se inocularon utilizando alginato de sodio como adherente (Viveganandan et al., 2000), para lo cual se preparó una solución de alginato al 2% y se agregaron 5 ml de la misma a un matraz de 25 ml conteniendo el inóculo a una concentración entre 10^6 y 10^7 células $\cdot\text{ml}^{-1}$. La suspensión se homogenizó con la ayuda de un vortex y se colocaron dentro del matraz 100 semillas de maíz previamente desinfectadas. Todo se llevó a un agitador durante una hora. Por último, se transportó el material biológico inoculado a una cámara de flujo laminar dejándose escurrir los matraces a través de un colador de gasa médica estéril, hasta obtener un secado de la semilla a la temperatura ambiente.

3.3 Efecto de *Bacillus megaterium* con potencial promotor del crecimiento en la germinación de semillas de maíz (*Zea mays*).

Para esto se procedió a la inoculación bacteriana y siembra de 125 semillas de Maíz con la cepa *B. megaterium* con una concentración 1:4 con dilución de alginato de sodio al 2%, 125 semillas con la cepa *B. megaterium* con una concentración 2:4 con dilución de alginato de sodio al 2%, y 125 semillas para el testigo respectivo no inoculado, Las pruebas de germinación se llevaron a cabo con el método de toalla de papel. 25 semillas para cada tratamiento con cinco repeticiones en diseño completamente aleatorio e incubadas en la cámara de crecimiento a 25 ± 2 °C, con una humedad relativa de 45%.

Después de 7 días, se contó el número de semillas germinadas. Se midió la longitud de la raíz y el tallo de las plántulas individuales para determinar el índice de vigor con la siguiente fórmula: índice de vigor = (longitud media de la raíz + longitud media del tallo) x% de germinación.

3.3.1 Porcentaje de inoculación.

Se procesaron las raíces para la determinación endofítica empleando una modificación del método de Keifeld y Chet (1992). Se cortó la raíz por debajo de la corona, posteriormente se remojó en una solución de hipoclorito al 5 % por 5 min, se lavó 3 veces con SDW por dos minutos y se colocaron en toallas de papel estéril para secar. Se cortaron las raíces en 5 partes iguales y se colocaron sobre la superficie de TSM. Se encubieron las placas sin sellar a 20°C en la oscuridad por 7 días y se registró la presencia del crecimiento del micelio de *B. megaterium* fuera de la raíz. Se cotejó la calidad de la esterilización superficial, se utilizó el agua de lavado final cada 20 muestras. El porcentaje de colonización está basado en el número de piezas de raíces infectadas, donde una pieza =20% y 5=100%.

3.3.2 Peso seco de tallo.

Para evaluar la evolución de *B. megaterium* en la germinación del maíz se separaron las partes aéreas de las plantas para la determinación del peso seco. El material aéreo se colocó en bolsas de papel rotuladas, secadas y previamente pesadas en una balanza analítica, y llevado a una estufa con circulación de aire forzado a 70 °C durante 72 h para la determinación del peso seco.

3.3.3 Peso seco de la raíz.

Se avaluó el potencial de promoción de crecimiento, midiendo la longitud de la raíz y se determinó el peso seco. Y se compararon los resultados con el control sin *B. megaterium*.

3.4 Diseño experimental.

Se realizó un experimento factorial de A x B con 15 repeticiones, donde el factor A, fueron los genotipos de maíz empleados (a1: AGR y a2: ABT 1126); el factor B, fueron las

concentraciones del inóculo de *B. megaterium* (1:25%, 2:50% y 3:0%). Se realizaron cinco repeticiones, dando un total de 30 unidades experimentales.

3.5 Análisis de datos.

Los datos de las variables determinadas serán sometidos a análisis de varianza y comparación de medias (Tuckey, 0.05), con el paquete estadístico SPSS.

IV.-RESULTADOS

4.1 Caracterización de *Bacillus megaterium*.

Bacillus megaterium es una bacteria Gram positiva, principalmente aeróbica que produce esporas y que se encuentra en diversos hábitats, desde el suelo hasta el agua (Martin *et al.*, 1995). De acuerdo a pruebas realizadas por otros autores señalan que *B. megaterium* tiene forma de una varilla o cadena de forma cilíndrica (Amornrat, 2009). Lo que en nuestros aislados descritos anteriormente confirman que se trata de esta bacteria que a continuación se representa en la Figura 2

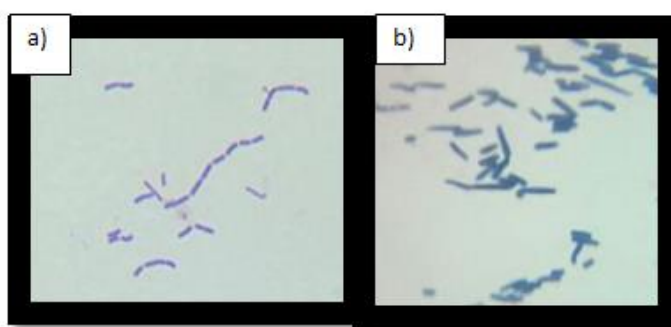


Figura 2: Caracterización de *Bacillus megaterium*, es una bacteria Gram-positiva figura a) en forma de cadena (Amornrat, 2009) y de forma cilíndrica figura b) resultado obtenidos en este trabajo.

4.2 Evaluación del efecto de *B. megaterium* sobre las variables (% de inoculación, Peso seco de tallos, Peso seco de la raíces).

En este trabajo la cepa bacteriana de *B. megaterium* fue evaluada su capacidad de promoción del crecimiento vegetal y comparada las variables de germinación, longitud de tallo y raíz, así como sus respectivos pesos frescos y seco, utilizando como modelo experimental a maíz (*Zea mays* L.) mediante la inoculación de dos genotipos uno comercial (ABT 1126) y el otro cosechado de maíces nativos de cañón de Jimulco (AGR), empleando diferentes concentraciones de la cepa (25,50 y 0 %) en condiciones de laboratorio.

Se muestra a continuación los datos corridos en los distintos tratamientos siendo así que el genotipo (AGR) expresa un mayor % de germinación podría decirse que por el efecto de la bacteria *B. megaterium* pero hay una doble entrada ya que el genotipo comercial (ABT 1126) muestra un mayor promedio de longitud de tallo esto representado en la figura 3.

Resultados en la promoción de pesos seco de raíz y tallo por la cepa *B. megaterium* podría decirse que en los tratamientos 2 y 4 que es a una concentración del 50% demuestran una mayor acumulación de biomasa figura 4.

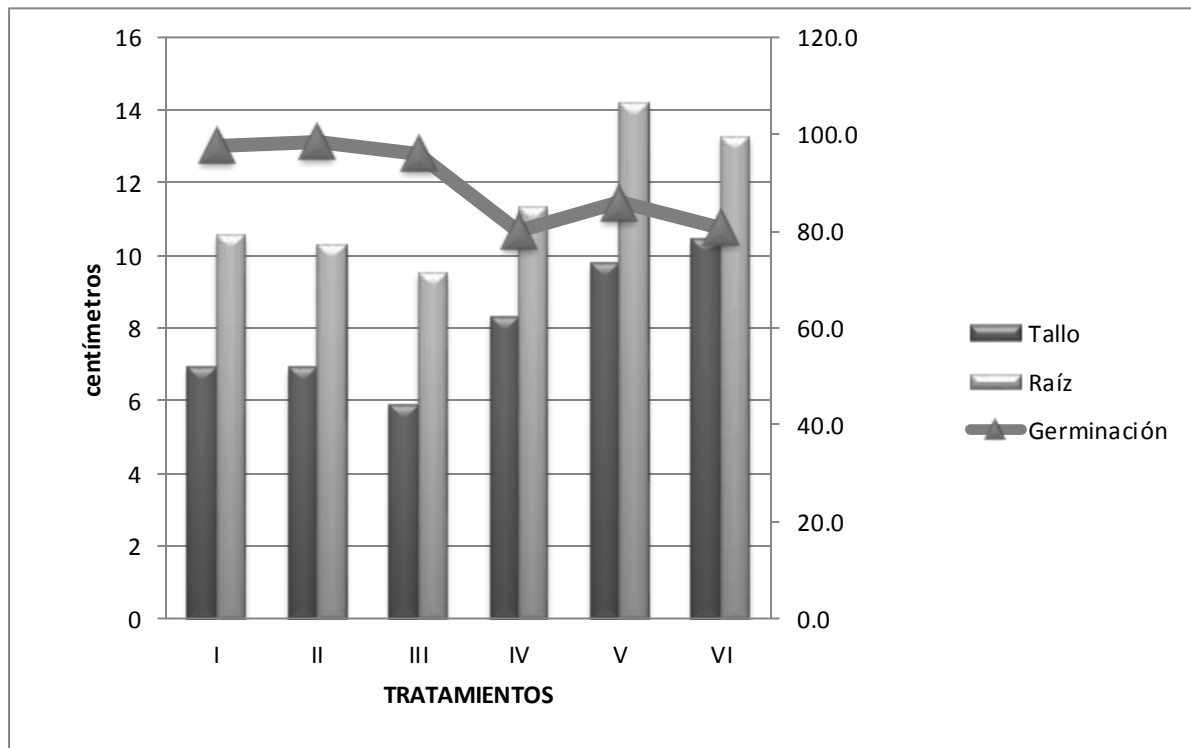


Figura 3. Resultados de crecimiento de tallo y raíz (cm) y germinación (%) de los diferentes tratamientos experimentales

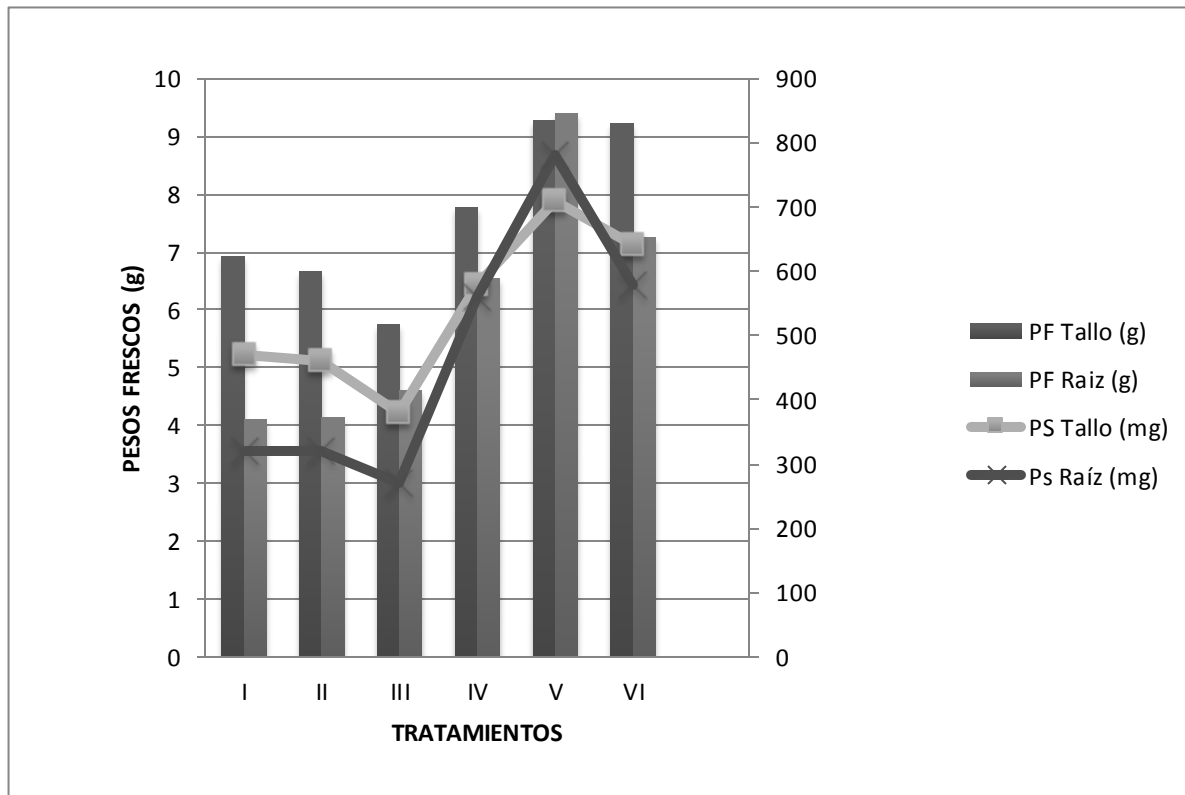


Figura 4. Resultados del peso fresco en relación al peso seco de raíz y tallos de los diferentes tratamientos experimentales.

En las siguientes figura se puede observar como las distintas concentraciones de *B. megaterium* muestran efecto y como los genotipos expresan su carácter genético ya que se compara lo comercial con lo autóctono

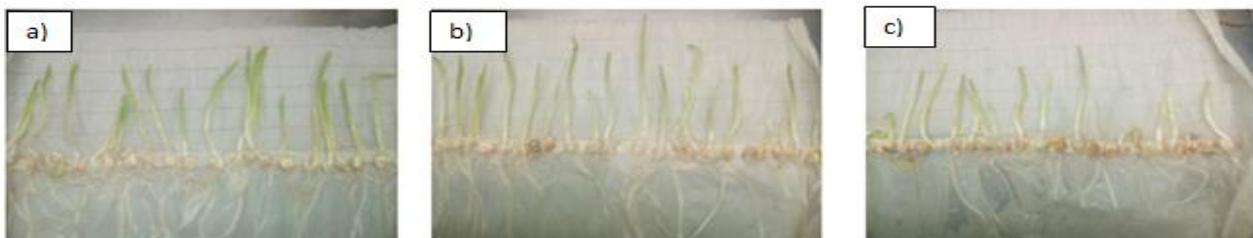


Figura 5. Genotipo AGR., a) Plantas inoculadas con un 25% de la cepa *B. megaterium*., b) Plantas inoculadas al 50% con *B. megaterium* y c) control

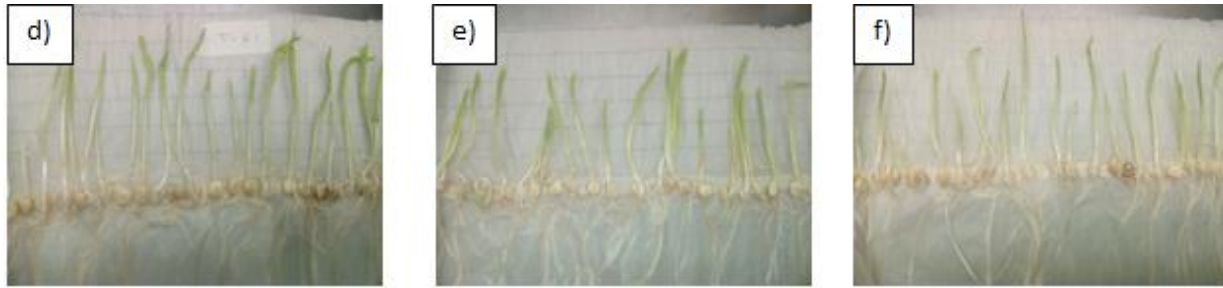


Figura 6: Genotipo ABT 1126, d) inoculado con *B. megaterium* con una concentración al 25%, e) con una concentración al 50%, y f) como control.

4.3 Diseño experimental –Análisis

Los tratamientos demostraron mediante la corrida de datos con el paquete estadístico SPSS. Que hay un gran coeficiente de variación entre tratamientos esto en el porcentaje de germinación que lo expresó mayor el genotipo a) AGR a una concentración del inoculo bacteriano al 50% esto traducido al valor de 92.4% de plantas germinadas comparado con el 88.4% de plantas no inoculadas Cuadro 1.

Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F. Calculada	Pr > F
tratamientos	5	1809.066667	361.8133333	7.71	0.0002
Genotipo	1	1672.5333333	1672.5333333	35.64	0.0001
Concentración	2	97.066667	48.5333333	1.03	0.3709
Gen*Concen	2	39.466667	19.7333333	0.42	0.6615
Error	24	1126.400000	46.9333333		
Total	29	2935.466667			

Cuadro 1. Resultados de ANOVA para la inoculación de genotipos de maíz con *B. megaterium*

De acuerdo con el análisis de medias, no se encontraron diferencias entre tratamientos para % de germinación, el mejor tratamiento (50% de inóculo) presentó 92.4% de germinación comparado con el peor 88.4 %, que correspondió al control.

En cuestión de longitud de tallo el genotipo ABT1126 comercial, presentó el mayor promedio de crecimiento (9.37 cm), esto se podría deber a su genética ya que es un híbrido comercial. Mientras que el otro genotipo, solamente alcanzó 6.55 cm.

V.- DISCUSIÓN

La promoción directa de PGPR implica proporcionar a la planta sustancias promotoras del crecimiento vegetal que son sintetizadas por las bacterias que facilitan la absorción de ciertos nutrientes de las plantas del medio ambiente. El género *Bacillus* han sido reportadas como PGPR (Saharan *et al.*, 2011).

Hay una serie de metabolitos que son liberados al medio ambiente por estas cepas al aumentar la disponibilidad de nutrientes de las plantas (Barriuso *et al.*, 2008). Esto hace que la germinación sea mayor

El uso de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en la agricultura se denomina biofertilización. Es considerada una biotecnología que contribuye al desarrollo sostenible ya que favorece el desarrollo de los cultivos agrícolas (Hernández-Flores *et al.*, 2012). Sugiriendo la técnica de bioiniciación como un método prometedor para la aplicación bacteriana para aumentar la productividad de los cultivos ya que estimula el proceso de germinación y la fijación de biomasa en la proporción de mayor porcentaje de peso seco.

VI.-CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo, demuestran que la bioinmersión con la cepa nativa de *B. megaterium* se mejoró la capacidad de germinación en las semillas de maíz (*Zea mays*

L.) y que las plántulas crezcan de manera uniforme, además, se encontró una buena relación entre peso seco de la raíz y tallo, producto de la inoculación microbiana. Se puede concluir que los microorganismos tienen el potencial de proliferar, colonizar y producir crecimiento vegetal durante el proceso de germinación. Esta tecnología de bioinmersión puede ser de interés y de valor para los productores. Requiere de mayores estudios por parte de los profesores del Programa Docente de Ingeniero en Agroecología

En este sentido la hipótesis de este trabajo se cumple ya que los tratamientos que mayor expresaron el porcentaje de germinación fueron los inoculados con esta cepa se recomienda para futuros trabajos evaluar mayor las concentraciones del inoculo bacteriano ya sea con micro-encapsulamiento o por bioinmersión con la semillas protegida.

VII.- REFERENCIAS.

- Agarwhal S. y Shende S.T. 1987. Tetrazolium reducing microorganisms inside the root of Brassica species. *Curr Sc.* 56:187–8.
- Ahemad M. y Kibret M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J. King Saud. Univ-Sci.* 26:1–20

- Amornrat C.M. 2009. Development of *Bacillus megaterium* formulations for suppression of rice sheath blight disease and study of mechanisms of biocontrol. Pharmaceutical Sciences. Prince of Songkla Doctor en Filosofía en Ciencias Farmaceuticas. 196 p.
- Anitha D., Vijaya T. y Reddy N.V. 2013. Microbial endophytes and their potential for improved bioremediation and biotransformation: a review. Indo. Am. J. Pharm. Res. 3: 6408–17.
- Aquiahuatl R.M., Volke S.T., Prado B.L., Shirai M.k., Ramírez V.F., y Salazar G.M. 2012. Manual de prácticas de laboratorio Microbiología general. U.A.M. Iztapalapa. México.
- Bacilio-Jimenez M., Aguilar-Flores S., Ventura-Zapata, E., Pérez-Campos, E., Bouquelet, S. y Zenteno, E. 2003. Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. Plant Soil. 249:271–277.
- Bacon C.W. y D.M. Hinton. 2006. Bacterial endophytes: The endophytic niche, its occupants, and its utility. In: Plant-Associated Bacteria. Gnanamanickam SS (ed). Springer. Dordrecht, Netherlands. 155–194.
- Bai Y., Muller D.B. y Srinivas G. 2015. Functional overlap of the *Arabidopsis* leaf and root microbiota. Nature. 528:364–379.
- Bais H.P., Weir T.L. y Perry L.G. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Ann. Rev. Plant Biol. 57:233–66.
- Bakker A. W. y Schippers B. 1986. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp-mediated plant growth-stimulation. Soil Biol. Biochem. 19:451-457.
- Barriuso J., Ramos Solano, B., Lucas, J.A., Probanza Lobo, A., García-Villaraco, A. Y Gutierrez Mareño, F.J. Solano B.R. 2008. Ecology, genetic diversity and screening strategies of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). In: Plant-bacteria interactions. Ahmad, I., Pitchel, J. y Hayat, S. Edit. Wiley-VCH. Weinheim. Ch. 1. 1-18.

- Berg G., Fritze A. y Roskot N. 2001. Evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from different host plants of *Verticillium dahlia* Kleb. J. Appl. Microbiol. 156:75–82.
- Bulgarelli D., Garrido-Oter R., Munch P.C. 2015. Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. Cell Host. Microb. 17:392–403.
- Camelo R., M., Vera M., S.P. y Bonilla B., R.R. .2011. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Rev. Corpoica-Ciencia Tecnol. Agrop. 12:159-166
- Cano M.A., 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp y *Pseudomonas* spp. Rev. U.D.C.A Actual. Divul. Cient. 14:15-31.
- Chakraborty A.P., Dey P. y Chakraborty B. 2011. Plant growth promotion and amelioration of salinity stress in crop plants by a salt-tolerant bacterium. Rec. Res. Sci. Technol. 3:61–70.
- Chávez L., Álvarez A., y Ramírez R. 2012. Apuntes sobre algunos reguladores del crecimiento vegetal que participan en la respuesta de las plantas frente al estrés abiótico. Cult. Trop. 33: 47-56
- Choudhary D.K., Sharma K.P., Gaur R.K., 2011. Biotechnological perspectives of microbes in agro-ecosystems. Biotechnol. Lett. 33:1905–1910
- Compant S., Clement C. y Sessitsch A. 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. Soil Biol Biochem; 42:669–678.
- Cortés-Jiménez J.M., Ortiz-Ávalos A.A., Zazueta-Encinas G., y Ruiz-Vega T.J. 2009. Efecto de labranza primaria en trigo, en el valle del Yaqui, Sonora. Primer simposium internacional de agricultura ecológica. Pp. 342-348
- De La Fuente L., Landa B.B., and Weller D. M. 2006. Host crop affects rhizosphere colonization and competitiveness of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens*. Phytopathology 96:751- 762.
- Dosreis F.B. 2000. Occurrence of diazotrophic bacteria in different sugar cane genotypes. Pesq. Agrop. Bras. 35:985-994

- Drogue B., Sanguin H. y Borland S. 2013. Host specificity of the plant growth-promoting cooperation between *Azospirillum* and rice. In: Symposium on Bacterial Genetics and Ecology. Slovenia: Ljubljana, 1.
- Egamberdieva D. y Lugtenberg B. 2014. Use of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria to Alleviate Salinity Stress in Plants. In: Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses. Miransari, M. (eds). Vol. 1. Springer, New York, NY.
- El-Mohamedy S.R, Abd-Alla M.A. y Badiaa R.I. 2006. Soil amendment and bio-priming treatments as alternative fungicides for controlling root rot diseases on cowpea plants in Nubria province. Res. J. Agr. Biol. Sci. 2:391–398.
- El-Mougy N.S. y Abdel-Kader M.M. 2008. Long-term activity of biopriming seed treatment for biological control of faba bean root rot pathogens. Austral. Plant Path. 37:464–471.
- Gamalero E., Lingua G. y Berta G. 2003. Methods for studying root colonization by introduced beneficial bacteria. Agronomie. 23:407–18.
- Garbero M., Pedranzani H.E., Zirulnik F., Molina A., Pérez-Chaca M.V., Vigliocco A. y Abdala G. 2011. Short term cold stress in two cultivars of *Digitaria eriantha*: effects on stress-related hormones and antioxidants defense system. Acta Phys. Plant. 33:497-507.
- Garg N. y Geetanjali R. 2007. Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: process and signaling. A review. Agron. Sustain. Dev. 27:59–68.
- Gholami A., Shahsavani S. y Nezarat S. 2009. The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. Proc World Acad Sci Eng Technol;49:19–24.
- Glick B.R. 2012. Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. Scientifica. 2012:1-15.
- Glick B.R., Karaturovi D.M. y Newell P.C. 1995. A novel procedure for rapid isolation of plant growth-promoting pseudomonads. Can. J. Microbiol. 41:533-536.
- Gong M., Wang J.D., Zhang J., Yang H., Lu X.F., Pei Y. y Cheng J.Q. 2006. Study of the antifungal ability of *Bacillus subtilis* strain py-1 in vitro identification of its antifungal substance (Iturin A). Acta Biochim. Biophysica Sinica. 38: 233–240.

- Gururani M.A., Upadhyaya C.P. y Baskar V. 2012. Plant growth promoting rhizobacteria enhance abiotic stress tolerance in *Solanum tuberosum* through inducing changes in the expression of ROS-scavenging enzymes and improved photosynthetic performance. *J. Plant. Growth Regul.* 32:245–58.
- Hayat R., Ali S., Amara U., Khalid R. y Ahmed I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann. Microbiol.* 60:579–598.
- Hernández-Flores, Munive-Hernández L., Sandoval-Castro J.A., Martínez A., Villegas-Hernández D. y Carmen M. 2012. Poblaciones bacterianas nativas: alternativa sustentable para la agricultura. *Terra Latinoamericana.* 30:129-138
- Jeffries P., Gianinazzi S., Perotto S., Turnau K. y Barea J.M. 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biol. Fertil. Soils* 37:1–16.
- Jensen B., Knudsen M.B. y Madsen M. 2004. Biopriming of infected carrot seed with antagonist, *Clonostachys rosea*, selected for control of seedborne *Alternaria* spp. *Phytopathology.* 94:551–60.
- Kende H., and Zeevaart J.A. 1997. The Five “Classical” Plant Hormones. *Plant Cell.* 9:197-121.
- Khalid A., Arshad M., Shaharoon B. y Mahmood T. 2009. Plant growth promoting rhizobacteria and sustainable agriculture. In: *Microbial strategies for crop improvement.* Khan. M.S., Zaid, A. y Musarrat, J. Edi. Ch. 7. Springer. Ney York. NY. 133-161.
- Kumara H., Bajpaib V.K., Dubeya R.C., Maheshwaria D.K. y Kang S. C. 2010., Wilt disease management and enhancement of growth and yield of *Cajanus cajan* (L) var. Manak by bacterial combinations amended with chemical fertilizer. *Crop Protection.* 29:591–598.
- Lugtenberg B. y Kamilova F. 2009. Plant-growth-promoting-rhizobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 63:541–556.
- Mahmood A., Turgay O.C., Farooq M. y Hayat R. 2016. Seed biopriming with plant growth promoting rhizobacteria: a review. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92. 1-14.
- Malusá E. y Vassilev N. 2014. A contribution to set a legal framework for biofertilisers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98:6599–6607.

- Martin L., Prieto M.A., Cortes E. y Garcia J.L. 1995. Cloning and sequencing of the *pac* gene encoding the penicillin G acylase of *Bacillus megaterium* ATCC 14945. FEMS Microbiol. Lett. 125:287-292.
- Martínez-Viveros O., Jorquera M.A, Crowley D.E., Gajardo G. y Mora M.L. 2010. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. J. Soil Sci. Plant Nutr. 10: 293-319.
- Moeinzadeh A., Sharif-Zadeh F. y Ahmadzadeh M. 2010. Biopriming of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed with *Pseudomonas fluorescens* for improvement of seed invigoration and seedling growth. Aust J Crop Sci. 4:564.
- Muller H. y Berg G. 2008. Impact of formulation procedures on the effect of the biocontrol agent *Serratia plymuthica* HRO-C48 on *Verticillium* wilt in oilseed rape. Biol. Control. 53:905–916.
- Nayaka S.C., Niranjana S.R. y Shankar A.C. 2010. Seed biopriming with novel strain of *Trichoderma harzianum* for the control of toxigenic *Fusarium verticillioides* and fumonisins in maize. Arch. Phytopathol. 43:264–282.
- Nelson L.M. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospect for new inoculants. Crop Manage.3:1-7.
- Patten C. y Glick B.R. 1996. Bacterial biosynthesis of Indole-3-acetic acid (review). C. J. Microbiol. 42: 207-220.
- Pedraza R., Kátia R.S., Fernández A., García I., Baca B., Azcón R. y Vera L.D. 2010. Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Rev. Corpoica - Ciencia Tecnol. Agrop.11:155-164.
- Pill W.G., Collins C.M. y Goldberger B. 2009. Responses of non-primed or primed seeds of “Marketmore 76” cucumber (*Cucumis sativus* L.) slurry coated with *Trichoderma* species to planting in growth media infested with *Pythium aphanidermatum*. Sci. Hortic.121:54–62.
- Porcel R., Amarreño Á.M., García-Mina J. M. y Aroca R., 2014. Involvement of plant endogenous ABA in *Bacillus megaterium* PGPR activity in tomato plants. BMC Plant Biol. 14:36-48.
- Reddy P.P. 2013. Recent Advances in Crop Protection. Springer. India.

- Reinoso P., Casadesús R., Suárez I., Gutiérrez A., Álvarez-Rivera J. y Pazos V. 2006. Aislamiento, selección e identificación de bacterias del género *Bacillus* antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. *Fitosanidad*. 10:187-191.
- Retuerto R., Rodríguez-Roiloa S., Fernández-Lema B., y Obeso J.R. 2003. Respuestas compensatorias de plantas en situaciones de estrés. *Rev. Ecosistemas*. Ene-Abril.1-7.
- Ryu C.M., Farag M.A., HuiHu C., Reddy M.S., Wei H.X. y Pare P.W., and Kloepper J.W. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *PNAS*. 100:4927-4932.
- Saber Z., Pirdashti H. y Esmaeili M. 2012. Response of wheat growth parameters to co-inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and different levels of inorganic nitrogen and phosphorus. *World Appl. Sci. J.*16: 213–9.
- Saha R., Saha N., Donofrio R.S. y Bestervelt L.L. 2016. Microbial siderophores: a mini review. *J. Basic Microbiol.* 53:303-317.
- Saharan B.S. y Nehra V. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria : A critical review. *Life Sciences Med. Res.* 2011:1–30.
- Trivedi P., Pandey A. 2008. Plant growth promotion abilities and formulation of *Bacillus megaterium* strain B 388 isolated from a temperate Himalayan location. *Indian J. Microbiol.* 48:342-347.
- Trivedi P., Pandey A., Palni L.M.S., Bag N. y Tamang M.B. 2005. Colonization of rhizosphere of tea by growth promoting bacteria. *Int. J. Tea Sci.* 4:19-25.
- Vacheron. V., Desbrosses G., Bouffaud M.L., Touraine B., Loccoz Y.M., Muller D., Legendre L., Wisniewski-Dye F. y Combaret C. 2013. Plant growth-Promoting *Rhizobacter* and root system functioning. *Frontiers Plant Sci.* 4:356-376.
- Vessey J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil.* 255:571-586.
- Walker T.S., Bais H.P. y Grotewold E. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.*132:44-51.

Wintermans C.A., Bakker P. y Pieterse M.J. 2016. Natural genetic variation in *Arabidopsis* for responsiveness to plant growth promoting rhizobacteria. *Plant Mol. Biol.* 90:623–634.