



**Universidad Autónoma de Querétaro**  
**Facultad de Ciencias Naturales**  
**Licenciatura en Biología**



Efecto de la inoculación de aislados bacterianos caracterizados como promotores del crecimiento vegetal en la producción de plántulas de jitomate (*Lycopersicum esculentum*).

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciado en Biología.

Presenta:

Miguel Abraham García Campos

Dirigido por:

Juan Ramiro Pacheco Aguilar

Sinodales:

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar

\_\_\_\_\_

M. en C. Kruskaia Karenia Caltzontzin Fernández

\_\_\_\_\_

Dr. Oscar Ricardo García Rubio

\_\_\_\_\_

Q. A. Laura Luna Martínez

\_\_\_\_\_

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

2012

México

La presente obra está bajo la licencia:  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

### Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

### Bajo los siguientes términos:



**Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



**SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

### Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.

## Resumen

Los microorganismos promotores de crecimiento en plantas son capaces de transformar los recursos que se encuentran en la rizósfera para facilitar la absorción de nutrientes o evitar que otros microorganismos patógenos infecten a las plantas. En el presente estudio, se aislaron once cepas bacterianas de una muestra de humus sólido a las que se nombraron H1 - H11. Los aislados se evaluaron en función de las propiedades bioquímicas asociadas a la promoción del crecimiento vegetal (solubilización de fosfatos, producción de ACC-deaminasa, producción de AIA, fijación de nitrógeno, producción de sideróforos), encontrando que todas las cepas tenían alguna característica relacionada con este efecto. Se inocularon las cepas en semillas de jitomate para evaluar los efectos en variables como: longitud del germinado, diámetro del tallo, porcentaje de germinación, porcentaje de presencia de raíces secundarias y porcentaje de cotiledones que emergieron de la semilla. Comparadas contra el control, únicamente H5, H7, H10 y H11 resultaron dar indicios de promoción de crecimiento vegetal. Las cepas antes mencionadas junto con cepas que se tenían seleccionadas de estudios anteriores (M6, P3 y P19) fueron inoculadas para evaluar su efecto promotor en la producción de plántulas de jitomate. Después de 34 días de crecimiento se evaluaron las siguientes variables: diámetro del tallo, altura de la plántula, peso fresco de la biomasa, peso del vástago tanto fresco como seco, peso de la raíz tanto fresca como seca. H7 fue el único aislado que presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) de manera positiva y fue en el peso del vástago tanto fresco como seco, aunque no todas de manera significativa H7 resultó ser mejor que el control en cinco de las siete variables que se analizaron. Seguido de H10 que resultó ser mejor que el control en cuatro variables. P3 y P19 resultaron mejores que el control en 3 variables. M6 resultó ser mejor que el control únicamente en la variable de la altura. Por lo que sugerimos que H7 y H10 sean evaluadas más a detalle ya que pueden ser cepas que promuevan el crecimiento vegetal del jitomate y probablemente de otras hortalizas.

## Summary

Plant growth promoters microorganisms are capable of transforming the resources that are in the rhizosphere to facilitate absorption of nutrients or other pathogens avoid infecting the plants. In the present study, eleven bacterial strains were isolated from a sample of solid humus and named H1 - H11. In all isolates was evaluated some of the biochemical properties that are associated with the promotion of plant growth (phosphate solubilization, production of ACC deaminase, production of IAA, nitrogen fixation, production of siderophores). All strains were shown to have properties to promote plant growth. Subsequently the strains were inoculated in tomato seeds to assess whether they showed any promoting effect. Variables that were evaluated are: length of sprouts, stem diameter, germination percentage, percentage of presence of secondary roots and percentage of cotyledons emerged from seed. Compared to control, only H5, H7, H10 and H11 were giving evidence to promote plant growth. The aforementioned strains with strains that were selected from previous studies (M6, P3 and P19) were inoculated to evaluate its promoting growth effect on tomato seedling production. After 34 days of growth the following variables were evaluated: stem diameter, seedling height, fresh weight of biomass, fresh and dry stem weight and weight of root fresh and dry. H7 was the only isolated presented significant differences ( $p < 0.05$ ) was positively in stem weight in both fresh and dry, although not significantly H7 was found to be better than the control in five of the seven variables analyzed . Followed by H10 that turned out to be better than the control in four variables. P3 and P19 were better than the control in 3 variables. M6 was found to be better than the control only in the height. So we suggest H7 and H10 to be evaluated more in detail because they may be strains that promote plant growth of tomato and probably to other vegetables.

## **Dedicatorias**

A mi poder superior ya que sin él no soy nada y en el todo lo soy.

A la vida ya que sin ella no podría existir, mucho menos podría estudiarla.

A todos aquellos que decidieron seguir con sus ideales a pesar de que la sociedad les decía que se iban a morir de hambre.

A todos aquellos que luchan por conquistarse a sí mismos.

A todos mis maestros de la escuela y de la vida que me han permitido por medio de sus enseñanzas y consejos estar en donde estoy.

## Agradecimientos

Esta tesis no hubiera podido concretar sin la dirección del Dr. Juan Ramiro Pacheco, gracias por aceptarme como tesista y permitirme aprender un poco de Química Agrícola y mucho de su visión personal y experiencia de vida. Con la ayuda de la M en C. Kruskaia Karenia Caltzontzin Fernández, Dr. Oscar Ricardo García Rubio y a la Q. A. Laura Luna Martínez; gracias por aceptar ser mis sinodales y en varias ocasiones contagiarme por su pasión por la microbiología y la investigación.

A mi familia por apoyarme, a mi padre, Rafa que me enseñó a disfrutar de la vida y a enfrentar mis problemas sin preguntarme porque, sino para que. A mi madre Lolita, que siempre me ha animado a seguir mis sueños y me ha ayudado a concretar muchos. A mis hermanos Denisse, Sahid y Aarón por permitirme compartir mi vida con ustedes, por enseñarme tanto y permitirme enseñarles un poco de lo que yo sé. Por estar siempre a mi lado aunque hace mucho que no estamos juntos. A todos mis tíos, tías, primos y primas que me han regalado un poco de cada quien y me dan el gusto de ser parte de esta gran familia de la cual estoy orgulloso.

A todos los “Mostros” que me dejan ver el reflejo de mí mismo y con amor me ayudan a superarme día con día. Por darme el privilegio de avanzar en este camino de vida juntos. A Tony, por ayudarme a entender la leyes universales que rigen mi vida. A Rulas por enseñarme a reír de mis penas y seguir adelante sin tomarme tan enserio. Al Mijomio, Aarón, el Abogado, Momia, Lazarock, Chaparrito, Demian, Yuca, Chats, Manis, Dander y un sinfín de hermanos más.

A todos mis amigos que de alguna u otra forma han marcado una parte de mi vida. A todos mis amigos de CEL con los que crecí, reí, jugué y pagué castigos juntos; pero sobre todo encontré amigos para siempre. A mis amigos del Cinvestav Irapuato, de la UNAM Campus Juriquilla. A mis colegas de la UAQ, por compartir esta pasión conmigo, por todo lo que aprendimos juntos durante nuestra formación y deformación: Chino, Tomy, Evy, Anaid, Brau, Kmila, Mosk, Markillo, Elisa, Jerry, Aby, Endospora, Chuy; a los enanos, a los Chukys y demás personajazos que le dan vida a tan bella facultad. Pero especialmente a mi gran amiga Pauli, por ser la voz de mi conciencia dentro de mi inconciencia, una excelente consejera y fuente de inspiración. A todos mis amigos en Koppert; Emilo, Poncho, Chucho y demás quienes recientemente me acompañan en mi nueva etapa laboral y con sus experiencias me ayudaron a concretar esta tesis.

Por último a Valentina. Gracias por estar a mi lado y haber aceptado el kit completito. Por ayudarme a explotar mi potencial aun cuando ni yo mismo creo tenerlo. Me encanta la persona que poco a poco he llegado a ser desde que estoy a tu lado. Te amo!

## Índice

<i>Summary</i> .....	3
DEDICATORIAS .....	4
AGRADECIMIENTOS .....	5
ÍNDICE.....	6
ÍNDICE DE CUADROS .....	7
ÍNDICE DE FIGURAS .....	8
I. INTRODUCCIÓN .....	9
II. ANTECEDENTES .....	11
II.1 MICROBIOLOGÍA DEL SUELO.....	11
II.2 MICROORGANISMOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO EN PLANTAS .....	11
II.2.1 <i>Micorrizas</i> .....	12
II.2.2 <i>Rizobacterias</i> .....	13
II.2.2.1 Fijación biológica de nitrógeno .....	14
II.2.2.2 Solubilización de fosfatos.....	15
II.2.2.3 Producción de sideróforos .....	16
II.2.2.4 Producción de ACC deaminasa .....	16
II.2.3 Control biológico de fitopatógenos.....	17
III. HIPÓTESIS.....	18
IV. OBJETIVOS .....	19
IV.1 OBJETIVO GENERAL .....	19
IV.2 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
V. MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
V.1 ORIGEN DE LOS AISLADOS DE ESTUDIO.....	20
V.2 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS AISLADOS OBTENIDOS DE HUMUS .....	21
V.2.1 <i>Capacidad solubilizadora de fosfatos</i> .....	21
V.2.2 <i>Actividad ACC deaminasa</i> .....	22
V.2.3 <i>Producción de AIA</i> .....	22
V.2.4 <i>Fijación biológica de nitrógeno</i> .....	23
V.2.5 <i>Producción de sideróforos</i> .....	23
V.3 <i>Escrutinio de los aislados obtenidos del humus</i> .....	23
V.4 PRODUCCIÓN DE PLÁNTULA EN JITOMATE .....	24
VI. RESULTADOS.....	26
VI.1 AISLADOS BACTERIANOS DEL HUMUS.....	26
VI.2 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS AISLADOS OBTENIDOS DE HUMUS.....	27
VI.3 ESCRUTINIO DE LOS AISLADOS OBTENIDOS DEL HUMUS.....	28
VI.4 PRODUCCIÓN DE PLÁNTULA EN JITOMATE.....	30
VII. DISCUSIÓN.....	37
IX. LITERATURA CITADA .....	39

## Índice de cuadros

Tabla 1: Características de los aislados empleados en el presente estudio. ....	20
Tabla 2: Concentraciones de inoculación de las cepas. ....	25
Tabla 3: Descripción morfológica de los aislados obtenidos. ....	26
Tabla 4: Actividad bioquímica promotora de crecimiento en plantas de los aislados. .....	28
Tabla 5: Resultados del Escrutinio de los aislados del humus sólido. ....	29
Tabla 6: Comparación de los resultados obtenidos del escrutinio para los aislados. .....	30
Tabla 7: Resultados del ensayo de producción de plántula. ....	32
Tabla 8: Comparación de los resultados obtenidos del escrutinio para los aislados. .....	36



## Índice de figuras

Figura 1: Análisis de varianza (ANOVA) del diámetro de las plántulas.....	33
Figura 2: Análisis de varianza (ANOVA) de la altura de las plántulas.....	33
Figura 3: Análisis de varianza (ANOVA) de la biomasa fresca de las plántulas.....	34
Figura 4: Análisis de varianza (ANOVA) del vástago fresco de las plántulas. ....	34
Figura 5: Análisis de varianza (ANOVA) del vástago seco de las plántulas.....	35
Figura 6: Análisis de varianza (ANOVA) de la raíz fresca de las plántulas. ....	35
Figura 7: Análisis de varianza (ANOVA) de la raíz seca de las plántulas.....	36

## I. Introducción

En la actualidad existe una mayor demanda en la producción de alimentos. Por lo que se ha recurrido a la agricultura intensiva empleando un uso excesivo de agroquímicos para la fertilización de las plantas, el control de plagas y enfermedades, que incrementan el costo de producción y disminuye la calidad del producto. Por lo que es necesario emplear tecnologías que nos permitan aumentar la productividad de las cosechas y que a su vez optimice el consumo de agroquímicos; sin causar efectos negativos al ambiente.

Algunos microorganismos que habitan el suelo tienen la capacidad de metabolizar componentes orgánicos y minerales interviniendo así en los ciclos de los nutrientes. Algunos más participan en el control biológico de enfermedades y plagas (Kibblewhite *et al.*, 2007) así como en la germinación y crecimiento de las plantas.

Debido a la preocupación sobre de los efectos secundarios de los agroquímicos, existe un creciente interés en mejorar el entendimiento de las actividades de cooperación entre los microorganismos de la rizósfera y como pueden estos ser aplicados a la agricultura de hoy en día para disminuir el uso de agroquímicos (Barea *et al.*, 2005).

El jitomate (*Lycopersicum esculentum*) es una de las tres hortalizas más importantes a nivel mundial, puede ser cultivado todo el año en un clima templado. El jitomate es un componente principal de la dieta diaria de muchos países ya que se puede comer fresco o en diversas formas procesadas como el jugo, pulpa, puré, pasta, en vinagre, deshidratados, sopas, salsas, catsup, etc. Además constituye una fuente importante de minerales, vitaminas y antioxidantes;

vitamina C, vitamina E, licopeno,  $\beta$ -carotenos, luteína y flavonoides.

La producción mundial del jitomate se ha incrementado en un 300% en las últimas cuatro décadas. En el 2003 la producción mundial se estimó en 110 millones de toneladas, en una extensión de aproximadamente 4.2 millones de hectáreas; lo que significó 4.2 billones de dólares. De acuerdo con la FAO (2003) China posee el 25.9% de la producción de jitomate a nivel mundial, seguido de EEUU con el 12.3% y en tercer lugar se encuentra Turquía con el 9%. México con una extensión de 70 mil hectáreas representa el 1.68% del área mundial; con una producción total de 2.14 millones de toneladas que equivale al 1.93% de la producción mundial anual.

El cultivo del jitomate en México, también es importante como una fuente de empleo, se estima que para la producción de 75,000 ha de jitomate se emplean 172,000 trabajadores.

Por lo anterior es necesario impulsar tecnologías que nos permitan integrar una producción intensiva pero a la vez de bajo impacto al medio ambiente. Como lo son los microorganismos promotores de crecimiento vegetal. Aunque por otro lado, también debe ser atractiva para los productores, ya que de otra forma su aplicación será muy limitada.

## **II. Antecedentes**

### **II.1 Microbiología del suelo**

En el suelo, la rizósfera es la zona de la raíz de las plantas donde se encuentra una gran diversidad microbiana y donde establecen las relaciones benéficas planta-microorganismo (Barea *et al.*, 2005). La diversidad de los microorganismos que habitan el suelo es importante para la productividad de las plantas. En el suelo un microorganismo puede establecer diversos tipos de relación dependiendo el tipo de plantas. La simbiosis puede variar con distintos microorganismos dependiendo de la estación del año así como de la madurez de la planta (Morgan *et al.*, 2005).

### **II.2 Microorganismos Promotores de Crecimiento en Plantas**

El crecimiento de la planta puede ser limitado por la disponibilidad de los elementos esenciales, así como por la presencia de sustancias tóxicas. La interacción de la raíz con microorganismos benéficos, ayuda a la planta a adquirir los elementos esenciales y a evitar la bioacumulación de elementos tóxicos (Morgan *et al.*, 2005). Adesemoye y Kloepper (2009) encontraron que se puede disminuir hasta un 30 % el suministro de fertilizante sin afectar la productividad de la planta si se encuentra inoculada con microorganismos promotores de crecimiento o mejorar la producción del cultivo de manera significativa hasta con un 10 % menos del suministro de fertilizante recomendado.

Para que se establezca la simbiosis, la raíz de la planta produce exudados que favorecen el crecimiento de los microorganismos (Toal *et al.*, 2000). Por su parte la actividad microbiana afecta el patrón de crecimiento de las raíces, provee de nutrientes a las plantas y regula la cantidad de exudados de las mismas (Bowen & Rovira, 1999). Para las plantas, hay dos formas específicas de asociación planta-microorganismo: micorrizas y rizobacterias.

### **II.2.1 Micorrizas**

Las micorrizas forman parte de una simbiosis mutualista con la raíz de la planta. Más del 80 % de las plantas son capaces de formar esta simbiosis. En dicha asociación hay un flujo bidireccional de nutrientes. La planta le proporciona compuestos de carbono al hongo, y el hongo por su parte le facilita la absorción de minerales. El establecimiento de la red de micorrizas ofrece una serie de ventajas para la adquisición de nutrientes minerales: (1) las hifas del hongo se extienden más allá del área que abarca la raíz; (2) la hifa del hongo aumenta significativamente el área de absorción de nutrientes con respecto de las raíces que no poseen micorrizas; (3) las hifas son capaces de llegar a los intersticios que son demasiado pequeños para las raíces de las plantas, permitiéndole así la absorción de agua; y (4) algunas micorrizas son capaces de asimilar estados de N y P que la planta no puede absorber, particularmente formas orgánicas de dichos elementos (Morgan *et al.*, 2005). Además de esto; las micorrizas son capaces de proteger al hospedero de raíces invasoras o patógenos (Whipps, 2004). Esta protección puede ser de distintas maneras, como: producción de antibióticos, induciendo resistencia, creando competencia por los sitios de infección con patógenos y formando barrera físicas que evitan la infección (Morgan *et al.*, 2005).

## II.2.2 Rizobacterias

Las rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas, o PGPR (por sus siglas en inglés, Plant Growth Promoting Rizobacteria) deben tener tres características intrínsecas: (1) deben ser capaces de colonizar la raíz, (2) deben sobrevivir y multiplicarse en los microhábitats cercanos a la raíz, así como poder competir con el resto de la microbiota por lo menos el tiempo que se necesita para expresar las actividades de promover y proteger a la planta, y (3) deben promover el crecimiento de la planta. Se sabe que las PGPR participan en el control biológico de patógenos de plantas, en los ciclos de los nutrientes y/o en el crecimiento durante la germinación de la planta (Barea *et al.*, 2005; Zahir *et al.*, 2004). *Pseudomonas* y *Bacillus* son los géneros más comúnmente descritos como PGPR.

Actualmente se hacen pruebas con las cepas caracterizadas como PGPR para evaluar su efecto como biofertilizantes. Se inoculan en semillas para facilitar así la colonización de la raíz (Zahir *et al.*, 2004). Las PGPR se pueden dividir en dos grandes grupos: aquellas que están involucradas en el ciclo de los nutrientes fitoestimulación y aquellas que están involucradas en el control biológico de patógenos de plantas (Bashan & Holguin, 1998). Las PGPR que intervienen en el ciclo de los nutrientes pueden por ejemplo fijar nitrógeno o solubilizar fósforo u otros nutrientes en el suelo.

### II.2.2.1 Fijación biológica de nitrógeno

La asociación simbiótica más estudiada es la de las bacterias fijadoras de nitrógeno con las raíces. La fijación de nitrógeno es exclusiva de bacterias, ya que son las únicas que pueden sintetizar la enzima nitrogenasa, que reduce el  $N_2$  atmosférico a amonio en los nódulos de la raíz (Barea *et al.*, 2005). Principalmente las bacterias fijadoras de nitrógeno pertenecen a los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Azorhizobium*, que en conjunto son conocidos como rizobia. Dichas bacterias interactúan con las raíces de las leguminosas formando nódulos de fijación de nitrógeno (Sprent, 2002). Las especies *Rhizobium* spp. y *Bradyrhizobium* spp., se encuentran en el suelo de manera dominante en un estado saprobio. Cuando aparece un hospedero indicado, la bacteria lo infecta por los pelos radiculares. Las raíces de las leguminosas poseen la característica de producir exudados como flavonoides e isoflavonoides que inducen la expresión del gen *nod* (nodulación) de la bacteria. En los nódulos la planta le brinda los carbohidratos que las bacterias necesitan. Por su parte las bacterias fijan nitrógeno atmosférico que convierte en amidas y ureidas que posteriormente son transportadas por el xilema de la planta.

*Azospirillum* también es considerado como una PGPR, a pesar de su capacidad de fijar nitrógeno, su actividad más significativa es la de producir auxinas tipo fitohormonas que estimulan el crecimiento de la raíz de la planta, mejorando así su capacidad de absorber nutrientes (Dobbela *et al.*, 1999). Las cepas fijadoras de nitrógeno como *Ralstonia*, *Bukholderia* y *Methylobacterium* han sido aisladas de Fabaceas tropicales. Las características que une a todas éstas cepas es que todas poseen genes *nod* (Dakora, 2003). La asociación planta-microorganismo ha sido comercialmente hablando muy explotada. Las inoculaciones tanto de semillas como de suelo son usadas para un gran número de cultivos como: soja, frijoles, cacahuates y trébol.

### II.2.2.2 Solubilización de fosfatos

El elemento que quizá limite más el crecimiento de una planta es el fósforo, debido a que su estado más estable en el suelo es como fosfato ( $P_i$ ,  $H_2PO_4^-$ ) y la forma de  $P_i$  se encuentra en bajas concentraciones en la solución del suelo (2-10  $\mu M$ ). La escasez de fósforo biodisponible en la rizósfera, aun cuando los niveles de fósforo en un análisis de suelo son altos, hace que la planta aumente la cantidad de carbohidratos en la raíz. Incrementando la generación de nuevos brotes de raíz, crecimiento lateral de la raíz así como de pelos radiculares; para aumentar el área de suelo explorada por la planta. Por otro lado, la deficiencia de fósforo orgánico ( $P_i$ ) aumenta la cantidad de proteínas transportadoras de  $P_i$  y promueve el exudado de ácidos orgánicos, RNAsas y fosfatasa para movilizar el fósforo. Por lo general todo este proceso termina presentando una colonización de la raíz.

Las bacterias que pueden solubilizar fósforo o PSB (por sus siglas en inglés Phosphate Solubilizing Bacteria) se han identificado en diversos estudios, pero su efectividad es aún incierta. La capacidad de la PSB de facilitar el fósforo a la planta es muy limitada, ya que los compuestos que utiliza para poder solubilizar son fácilmente degradados, por lo que el fósforo es nuevamente fijado antes de que pueda ser aprovechado por la planta (Barea *et al.*, 2005).



### **II.2.2.3 Producción de sideróforos**

En ambientes de crecimiento con escasez de hierro, algunas PGPR producen compuestos de bajo peso molecular llamados sideróforos. La producción de sideróforos por PGPR juega un rol vital en el crecimiento de las plantas ya que les permite adquirir el ion hierro, que es necesario para crecer. Los sideróforos varían en cuanto a su afinidad por el hierro, así como por otros metales pesados. En general, las bacterias actúan como agente de biocontrol de fitopatógenos, debido a que los sideróforos que producen los hongos son menos afines al hierro (Sayyed *et al.*, 2004; Compant *et al.*, 2005).

### **II.2.2.4 Producción de ACC deaminasa**

Existen PGPR que contienen la enzima 1-amino-ciclopropano-1-carboxilasa (ACC) deaminasa, que utiliza como sustrato al ACC, precursor del etileno en las plantas, disminuyendo así los niveles de etileno y por ende los niveles de señales de estrés. Algunas semillas necesitan un estímulo de etileno para poder germinar, sin embargo, después de la germinación altos niveles de etileno pueden inhibir el crecimiento de las raíces. Las PGPR que poseen la ACC deaminasa, promueven el desarrollo de raíces fuertes. De igual manera, las plantas que se encuentran en simbiosis con dichas PGPR son significativamente más resistentes a factores de estrés como: inundaciones, metales pesados, salinidad, fitopatógenos y sequías (Penrose & Glick, 2003). Por otra parte, dicha enzima también se encuentra implicada en la nodulación en plantas de chícharo y alfalfa (Onofre-Lemus *et al.*, 2009).

### II.2.3 Control biológico de fitopatógenos

Las PGPR que han sido descritas como agentes de biocontrol de microorganismos fitopatógenos, presentan capacidades como: la reducción del crecimiento de saprobióticos, patógenos y la frecuencia de infecciones de la raíz a través del antagonismo microbiano y/o la estimulación del sistema inducido de resistencia en las plantas hospederas.

Los mecanismos por los cuales tienen efectos directos sobre el control de patógenos son diversos, como: competencia por sitios de infección, competencia por fuentes de carbono, nitrógeno u otros nutrientes, competencia por minerales por medio de la producción de sideróforos, producción de compuestos antimicrobianos como antibióticos y HCN, degradación de factores de germinación de patógenos y parasitismo. Estos efectos pueden ir acompañados de mecanismos indirectos como: implementación de nutrientes a la planta y compensación de daños, cambios anatómicos de la raíz, cambios en la población de microorganismos en la rizósfera, y la activación de resistencia en las plantas hospederas. Un agente efectivo de biocontrol de fitopatógenos, posee una combinación de varios mecanismos antes mencionados (Whipps, 2004). Dentro de las bacterias que han demostrado propiedades antagónicas con fitopatógenos, se encuentran géneros como *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Burkholderia* y *Pseudomonas* (Haas & Keel, 2003).

### **III. Hipótesis**

Los aislados bacterianos obtenidos de diferentes muestras ambientales (humus sólido, rizósfera de jitomate y cactáceas que crecen en la Cañada, El Marqués Querétaro) poseen actividades bioquímicas para promover la germinación de semillas y mejorar el crecimiento de plántulas de jitomate (*Lycopersicum esculentum*).

## **IV. Objetivos**

### **IV.1 Objetivo general**

Caracterizar aislados bacterianos en función de sus propiedades promotoras del crecimiento vegetal y evaluar su efecto en la producción de plántulas de jitomate.

### **IV.2 Objetivos específicos**

IV.2.1.- Aislar y caracterizar bacterias de una muestra de humus sólido en función de sus propiedades bioquímicas promotoras del crecimiento vegetal como la solubilización de fosfatos, fijación biológica de nitrógeno, producción de ácido indolacético, producción de sideróforos y actividad ACC deaminasa.

IV.2.2.- Evaluar diferentes aislados bacterianos (H1-H11) por su actividad promotora en la germinación y en la producción de plántulas de jitomate.

## V. Materiales y Métodos

### V.1 Origen de los aislados bacterianos de estudio

Las bacterias empleadas en el presente estudio, provienen de diferentes muestras de suelo. La cepa M6 es un aislado rizosférico de un cultivo de jitomate creciendo en suelo orgánico, dicho aislado fue obtenido y caracterizado por Mora (2010). Las cepas P3 y P19 provienen de la rizósfera de cactáceas que crecen en la Cañada, El Marqués Querétaro, estos aislados pertenecen a una colección del laboratorio de Plantas y Biotecnología Agrícola, de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro (Molina, 2011). Las propiedades de las cepas bioquímicas relacionadas al efecto promotor del crecimiento vegetal se muestran la Tabla 1.

**Tabla 1: Características de los aislados empleados en el presente estudio.**

Aislados	AIA (mgL <sup>-1</sup> )	Solubilización de PO <sub>4</sub> (mgL <sup>-1</sup> )	Fijación de N <sub>2</sub>	ACC deaminasa	Sideróforos
M6	4.20±0.40	55.80±1.70	+	+	+
P3	11.30±1.12	22.64±8.08	-		-
P19	7.09±0.04	60.80±9.70	-	-	-

AIA: ácido indolacético; ACC: 1-amino-ciclopropano-1-carboxilasa; ±: desviación estándar; +: positivo; -: negativo.

Estos aislados fueron elegidos por presentar la mayoría de las propiedades bioquímicas promotoras del crecimiento vegetal. Por otro lado las cepas H1 – H11 fueron aisladas de una muestra de humus sólido. Para ello se inocularon 100 µl de extracto de humus en placas petri con medio sólido Pikovskaya modificado (Ramachandran *et al.*, 2003) para bacterias solubilizadoras de fosfatos, con el fin de seleccionar el crecimiento de bacterias Gram positivas solubilizadoras de fosfatos.

## **V.2 Caracterización bioquímica de los aislados obtenidos de humus**

Para conocer el potencial de los aislados obtenidos del humus se caracterizaron de acuerdo a sus propiedades promotoras del crecimiento.

### **V.2.1 Capacidad solubilizadora de fosfatos**

Para determinar la eficiencia de solubilización de fosfatos los aislados se sembraron por picadura en cajas petri con medio sólido de Pikovskaya modificado, siguiendo el método propuesto por Ramachandran *et al.* (2003). Las cajas se incubaron por 10 días a 30<sup>o</sup> C. Al término del periodo se midió tanto el diámetro de crecimiento de la colonia y el diámetro del halo amarillo alrededor de la colonia para calcular la eficiencia de solubilización.

Para la determinación cuantitativa de fosfatos solubles, se inocularon 250 µL de los aislados en frascos con 25 ml de medio líquido Pikovskaya modificado, sin azul de bromofenol siguiendo el método propuesto por Ramachandran *et al.* (2003). Los frascos inoculados se pusieron en agitación constante por cinco días. Al término del periodo de incubación, las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm por 10 minutos. En tubos de ensayo, libres de fósforo con 8 ml de agua destilada y desmineralizada se colocó 1 ml del sobrenadante del cultivo y 1 ml de la solución reductora, dejando reaccionar por 30 minutos. Al término del periodo, se tomaron las lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 882 nm.

## **V.2.2 Actividad ACC deaminasa**

Para la determinación cualitativa de la actividad ACC-deaminasa, los aislados sembraron en cajas petri con medio sólido DF (Dworkin and Foster) siguiendo el método propuesto por Patten & Glick (2002). Las cajas se incubaron por 5 días a 30° C y al término se observaron los resultados tomando como positivos aquellos aislados que presentaban crecimiento. Para evitar falsos positivos, se volvió a tomar una muestra de los aislados que resultaron positivos y se rayó en otra caja petri con medio sólido DF y nuevamente se dejó incubar por 5 días a 30° C. Cuando volvieron a presentar crecimiento, se consideró que los aislados poseían actividad ACC-deaminasa.

## **V.2.3 Producción de AIA**

Para la determinación cuantitativa de la producción de AIA, los aislados se inocularon en tubos con 5 ml de caldo nutritivo con triptófano siguiendo el método propuesto por Glickmann & Dessaux (1995), posteriormente los tubos se dejaron en agitación constante por 3 días 250 rpm. Una vez concluido el periodo de incubación, el cultivo se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos. Al sobrenadante obtenido se le hizo una extracción fraccionada con éter de petróleo, el cual fue evaporado y el residuo resuspendido en 2 ml de metanol. Después, 1 ml de esta solución de este se puso a reaccionar con 2 ml de reactivo de Salkowski por 30 minutos. Al término del periodo, se tomaron las lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 530 nm.

## **V.2.4 Fijación biológica de nitrógeno**

Para la prueba de fijación biológica de nitrógeno, cada aislado fue inoculado en tres tubos de ensayo con medio semisólido de malato libre de nitrógeno (NFb) (Peña y Reyes, 2007). Dejando en incubación a 25° C por 14 días. Al término del periodo, aquellos tubos que presentaban una película subsuperficial que indica crecimiento fueron tomados como positivos.

## **V.2.5 Producción de sideróforos**

Para identificar producción de sideróforos, se pusieron 50 µL de inóculo primario de cada aislado en tres tubos de ensayo con 5 ml de medio Ácido Succinico, Fructosa y Triptofano (SFS) (Carcaño *et al.* (2006). Los tubos inoculados fueron puestos en agitación constante por cinco días. Al término del periodo de incubación, las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm por 5 minutos. Del sobrenadante se tomaron 500 µL y se pusieron a reaccionar con 500 µL del reactivo CAS por cuatro horas. Tomando como positivos aquellos que presentaron un cambio de color de azul a amarillo-naranja.

## **V.3 Escrutinio de los aislados obtenidos del humus**

Para poder discriminar los aislados provenientes del humus que tenían un efecto promotor de crecimiento, se inocularon 20 semillas por aislado y un control sin inocular. Las semillas se incubaron por una hora a 120 rpm a 25° C con una suspensión bacteriana de  $10^{-7}$  células  $\text{ml}^{-1}$  de cada aislado. Después, las semillas se colocaron en cajas petri con papel filtro humedecido. Las semillas se conservaron fueron puestas en obscuridad a humedad constante.



Con los datos obtenidos se hizo un análisis de varianza, en caso de presentar una diferencia significativa entre los aislados ( $p < 0.05$ ) se corrió una prueba de Dunnett para determinar cuál de estos tratamientos eran significativamente diferentes al control (Montgomery, 2003). Las cepas que resultaron mejores que el control, fueron consideradas para el ensayo de producción de plántula en jitomate.

#### **V.4 Producción de plántula en jitomate**

Aquellos aislados del humus, que tuvieron un efecto positivo en ensayo de germinación fueron seleccionados para el ensayo de producción de plántula de jitomate, junto con los aislados M6, P3 y P19. Para ello, se inocularon grupos de 100 semillas (Tabla 2). Se incluyó un grupo control, el cual no fue inoculado, sin embargo, se le dio el mismo tratamiento que al resto de los tratamientos. Sembrando las semillas inoculadas en semilleros de 200 cavidades, empleando como sustrato peat-moss estéril. Una vez germinadas las plántulas, se dejaron crecer bajo condiciones ambientales aplicándoles dos riegos con agua por día (mañana y tarde). Después de 15 días de la germinación, se comenzó con la fertilización empleando la siguiente fórmula: 0.75 g/L de nitrato de potasio, 0.175 g/L de fosfato monoamónico, 0.675 g/L de nitrato de calcio, 0.3 g/L de sulfato de magnesio y 0.05 g/L de sulfato ferroso.

**Tabla 2: Concentraciones de inoculación de las cepas.**

<b>Cepa</b>	<b>Volumen del inóculo en 20ml</b>	<b>Concentración de solución stock (cel/ml)</b>
H5	500 µl	2.8X10 <sup>9</sup>
H7	500 µl	2.9X10 <sup>9</sup>
H10	1 ml	2.04 X10 <sup>9</sup>
H11	1 ml	1.2 X10 <sup>9</sup>
M6	1 ml	5.6 X10 <sup>8</sup>
P3	1 ml	9.6 X10 <sup>8</sup>
P19	1 ml	6.2 X10 <sup>8</sup>
H5*	1 ml	7.4 X10 <sup>8</sup>
H11*	500 µl	1.57 X10 <sup>9</sup>
P3*	1 ml	9.6 X10 <sup>8</sup>

\* Dosis para la segunda repetición, ya que en la primera repetición presentó problemas de damping off.

Las plántulas se cosecharon a los 34 días después de la germinación. Para cada tratamiento se consideraron 6 grupos de 10 plántulas cada uno. Las variables registradas de este ensayo fueron altura, diámetro, peso fresco y seco del vástago y la raíz, se hizo un análisis de varianza y para los parámetros en los que existió una diferencia entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ) se corrió una prueba de Dunnett para determinar cuáles son significativamente diferentes del control (Montgomery, 2003). Las cepas que presentaron síntomas de damping off por lo que se repitió el mismo método con estas cepas.

## VI. Resultados

### VI.1 Aislados bacterianos del humus

Las cepas aisladas de la muestra de humus sólido, se describieron morfológicamente en base a la forma, borde, superficie, consistencia y elevación de las colonias. Dicha descripción se hizo después de 48 horas de crecimiento en agar nutritivo a 25° C (Tabla 3).

**Tabla 3: Descripción morfológica de los aislados obtenidos.**

<b>Cepa</b>	<b>Descripción morfológica</b>
H1	Colonias medianas, convexas, entera, con halos, siendo el halo intermedio más oscuro.
H2	Colonias grandes, convexas, con superficie papilada, entera con un centro rizoide.
H3	Colonias grandes, elevadas, enteras y con centro rizoide.
H4	Colonias grandes, convexas, irregulares (onduladas), con halos, bordes oscuros.
H5	Colonias grandes, convexas, enteras y con borde oscuro, con un halo arenoso en medio.
H6	Colonias medianas, planas, enteras, color mate, con un halo oscuro en medio.
H7	Colonias pequeñas, convexas, irregulares, color mate.
H8	Colonias grandes, ovaladas, enteras.
H9	Colonias grandes, irregulares, de aspecto costroso.
H10	Colonias pequeñas, irregulares, con bordes y centro más oscuros.
H11	Colonias medianas, irregulares (onduladas), color entero.

Los aislados crecieron en agar nutritivo a 25° C por 48 horas

## **VI.2 Caracterización bioquímica de los aislados obtenidos de humus**

En las pruebas bioquímicas (Tabla 4) podemos observar que la producción de AIA de los aislados obtenidos de la muestra de humus sólido presentaron un rango entre  $0.051 - 0.95 \text{ mg L}^{-1}$ . La cepa H3 es la que notablemente produce más AIA que el resto de los aislados. La solubilización de fosfatos de los aislados obtenidos de la muestra de humus sólido presentaron un rango entre  $6.61 - 122.31 \text{ mg L}^{-1}$  lo que nos indica que todos los aislados tienen la capacidad de solubilizar fosfatos siendo H1 el que mayor capacidad tiene, superando por mucho al resto de los aislados. En la prueba de eficiencia de solubilización con excepción de H8. Los aislados presentan una eficiencia de solubilización mayor o igual al 100%, siendo H5 la que tiene una mejor eficiencia. En la prueba de fijación biológica de nitrógeno sólo H6 y H8 resultaron negativos, el resto resultaron positivos para esta prueba. La prueba para la producción de ACC-deaminasa resultó positiva para todos los aislados. En cuanto a la prueba de producción de sideróforos únicamente resultó positiva para las cepas H5 y H6.

**Tabla 4: Propiedades bioquímicas del crecimiento en plantas de los aislados.**

Cepas	AIA (mgL <sup>-1</sup> )	Solubilización de PO <sub>4</sub> (mgL <sup>-1</sup> )	Eficiencia de solubilización (%)	Fijación de N <sub>2</sub>	ACC- deaminasa	Sideróforos
H1	0.06±0.04	122.31±25.56	311.10	+	+	-
H2	0.16±0.018	42.73±5.25	245.50	+	+	-
H3	0.95±0.12	27.17±10.03	322.20	+	+	-
H4	0.087±0.001	42.54±10.54	260.01	+	+	-
H5	0.07±0.0015	26.89±2.84	313.27	+	+	+
H6	0.051±0.001	30.47±6.82	275.00	-	+	+
H7	0.06±0.0006	6.62±34.37	208.33	+	+	-
H8	0.07±0.0015	43.11±25.62	0.00	-	+	-
H9	0.07±0.0015	31.88±5.72	1366.70	+	+	-
H10	0.06±0.0006	17.83±7.10	100.00	+	+	-
H11	0.06±0.0006	20.57±23.34	104.76	+	+	-

AIA: ácido indolacético; ACC: 1-amino-ciclopropano-1-carboxilasa; +: positivo; -: negativo.

### VI.3 Escrutinio de los aislados obtenidos del humus

Una vez que comprobamos que todos los aislados tienen al menos una característica bioquímica promotora del crecimiento en plantas, se procedió a evaluar dicha capacidad biológica. En el escrutinio de los aislados en un principio se tenía pensado únicamente registrar el porcentaje de germinación, el diámetro y la longitud de los germinados de cada grupo. Sin embargo con forme avanzó el ensayo, nos dimos cuenta de que en algunos tratamientos desarrollaban raíces secundarias y el número de germinados que presentaban cotiledones era un factor que variaba entre los tratamientos. Por lo que decidimos tomar en cuenta dichas variables en nuestro ensayo.

Podemos observar (Tabla 5) que con respecto al diámetro únicamente los germinados inoculados con H1 presentaron un grosor mayor al control. En la longitud del germinado los tratamientos que resultaron mayores al control fueron los inoculados con las cepas H3, H5, H7, H8, H9, H10 Y H11. Consideramos que el porcentaje de germinación no fue una variable en la que se pueda apreciar un efecto tanto negativo como positivo dentro de los tratamientos. El porcentaje de plántulas que presentaron raíces secundarias fue un factor en el que únicamente el tratamiento inoculado con la cepa H3 no resultó superior que el control. Por otro lado, el porcentaje de germinados que presentaron cotiledones resultaron ser mayores que el control aquellas que fueron inoculadas con las cepas H3, H5, H6, H7, H10 y H11.

**Tabla 5: Resultados del escrutinio de los aislados del humus sólido.**

Cepa	Diámetro (mm)		Longitud (mm)		% germ	% r. sec.	% cot
	Media	D.S.	Media	D.S.			
Control	0.75	0.11	48.92	9.51	85	29.41	76.47
H1	0.89	0.13	45.91	11.83	90	61.11	55.56
H2	0.78	0.08	54.47	16.48	90	44.44	66.67
H3	0.70	0.08	68.80	14.55	80	25.00	87.50
H4	0.78	0.08	58.58	24.20	85	41.18	76.47
H5	0.78	0.07	65.36	10.27	80	43.75	93.75
H6	0.70	0.14	53.95	15.04	95	57.89	78.95
H7	0.68	0.12	66.26	11.55	80	62.50	81.25
H8	0.80	0.11	69.37	16.49	95	57.89	57.89
H9	0.77	0.05	63.18	10.44	95	63.16	47.37
H10	0.75	0.06	71.34	11.90	75	53.33	93.33
H11	0.77	0.05	63.02	13.41	100	45.00	85.00

D.S. : desviación estándar; %: porcentaje; germ. : germinación; r. sec. : raíces secundarias; cot. :cotiledones.

Las diferencias de las variables que se analizaron en el escrutinio de los aislados no fueron significativas. Sin embargo, los valores nos permitieron darnos una idea de que aislados pudiesen tener algún efecto promotor en las plantas. Los aislados que demostraron ser mejores que el control en al menos 3 de las variables que medimos en este escrutinio son: H5, H7, H10 y H11 (Tabla 6). Dichos aislados fueron elegidos para continuar con el ensayo de producción de plántula.

**Tabla 6: Comparación de los resultados obtenidos del escrutinio para los aislados.**

Aislado	Díámetro	Longitud	% Raíces secundarias	% Cotiledones
H1	+		+	
H2			+	
H3		+		+
H4			+	
H5		+	+	+
H6			+	+
H7		+	+	+
H8		+	+	
H9		+	+	
H10		+	+	+
H11		+	+	+

+: variables para las cuales el aislado resulto mejor que el control.

## VI.4 Producción de plántula en jitomate

Con los aislados seleccionados del ensayo anterior y los aislados M6, P3 y P19 continuamos con el desarrollo de plántula de jitomate. Lo que podemos observar (Tabla 7) de las diferentes variables es que: con respecto al diámetro, no hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), sin embargo, hay plántulas mejores que el control; siendo las inoculadas con H7 las que presentaron el mayor diámetro, seguidas de H10 de acuerdo al análisis de varianza que se muestra en la Figura

1. En la variable de la altura tampoco se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), sin embargo, hay tratamientos mejores que el control; siendo H10 la más alta de todas, seguida de P19, H7 y por último M6 según el análisis de varianza (Figura 2). En el peso de la biomasa fresca, únicamente el tratamiento con H7 posee un peso mayor al control, aunque no de manera significativa ( $p < 0.05$ ). El resto de los tratamientos son menores, únicamente P19 y M6 de manera significativa (Figura 3). Con respecto al peso del vástago fresco, únicamente el tratamiento con H7 posee un peso mayor al control de manera significativa ( $p < 0.05$ ) de igual manera aunque no de manera significativa P3 y H10 (Figura 4). Para el peso del vástago seco nuevamente las plántulas inoculadas con H7 poseen un peso mayor al control de manera significativa ( $p < 0.05$ ) de igual manera aunque no de manera significativa H10, P3 y P19 tienen un peso mayor al control (Figura 5). En el peso de la raíz fresca todos los tratamientos tienen un menor peso que el control (Figura 6). Por último, en la variable que corresponde al peso de la raíz seca todos los tratamientos tienen un menor peso que el control (Figura 7).



**Tabla 7: Resultados del ensayo de producción de plántula.**

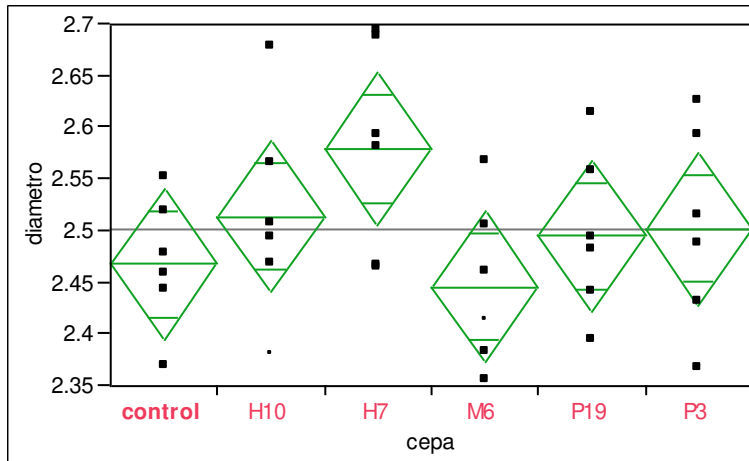
Cepa	Diámetro (cm)		Altura (cm)		Biomasa (g)		Vástago fresco (g)		Vástago seco (g)		Raíz fresca (g)		Raíz seca (g)	
	Promedio	D.S.	Promedio	D.S.	Promedio	D.S.	Promedio	D.S.	Promedio	D.S.	Promedio	D.S.	Promedio	D.S.
Control	2.47	0.05	8.96	0.25	23.49	1.27	14.66	0.78	1.28	0.08	8.56	0.72	0.60	0.07
H7	2.58	0.08	9.05	0.18	25.10	1.25	17.51	0.73	1.53	0.10	7.28	0.56	0.49	0.05
H10	2.51	0.07	9.46	0.19	22.83	1.34	15.22	1.12	1.40	0.15	7.34	1.34	0.48	0.09
M6	2.45	0.06	8.99	0.34	21.06	1.69	14.31	0.99	1.21	0.12	6.48	0.70	0.43	0.05
P3	2.50	0.08	8.78	0.27	22.43	1.12	15.34	1.23	1.34	0.13	6.80	0.53	0.41	0.03
P19	2.50	0.08	9.22	0.38	21.62	0.48	14.58	0.38	1.29	0.02	6.92	0.52	0.45	0.03

D.S.: desviación estándar

**Tabla 8: Resultado del segundo ensayo de producción de plántula.**

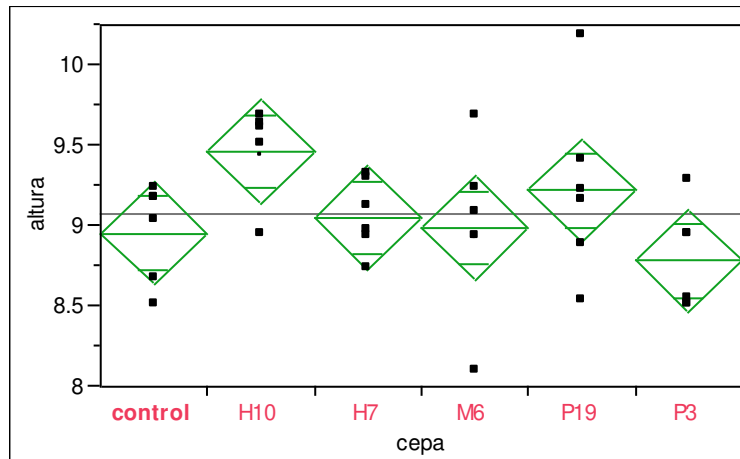
Control	3.40	0.07	9.59	0.41	30.11	1.08	22.44	0.91	1.92	0.12	7.65	0.88	0.50	0.07
H11	3.54	0.16	10.11	0.84	33.24	2.81	24.54	1.98	2.03	0.12	8.76	1.12	0.52	0.06
P3	3.72	0.10	10.46	0.81	35.46	2.12	25.64	1.43	2.08	0.10	9.76	0.68	0.60	0.10

D.S.: desviación estándar



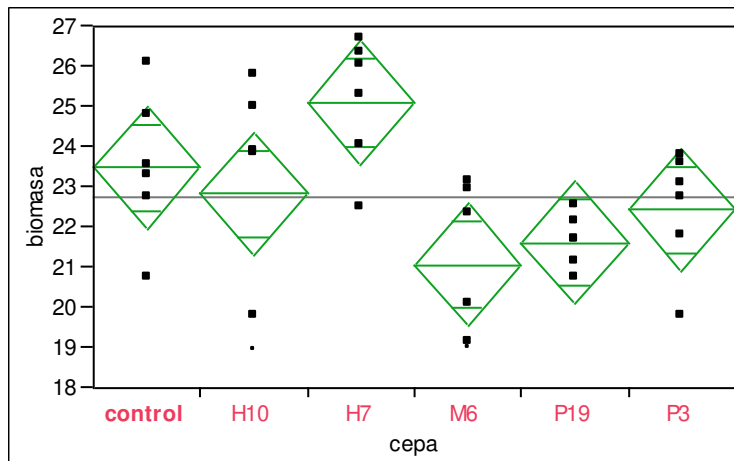
**Figura 1: Análisis de varianza (ANOVA) del diámetro de las plántulas.**

Los datos están expresados en cm; los rombos verdes representan el ANOVA y marcan el promedio de los datos (línea verde central del rombo) con su respectiva desviación estándar (líneas de los extremos que dividen el rombo).



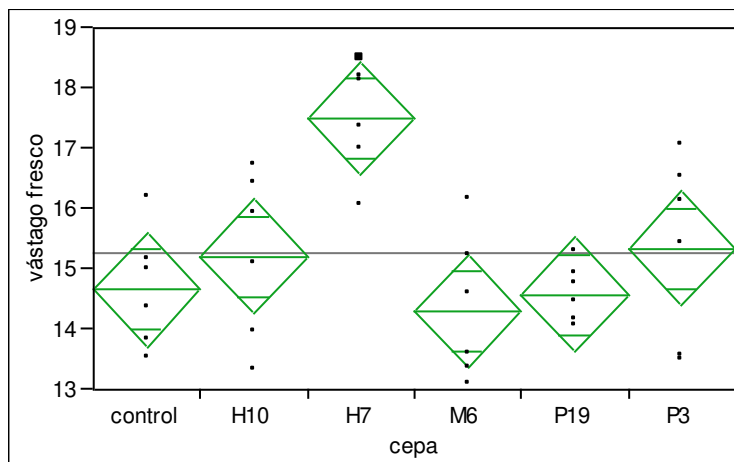
**Figura 2: Análisis de varianza (ANOVA) de la altura de las plántulas.**

Los datos están expresados en cm; los rombos verdes representan el ANOVA y marcan el promedio de los datos (línea verde central del rombo) con su respectiva desviación estándar (líneas de los extremos que dividen el rombo).



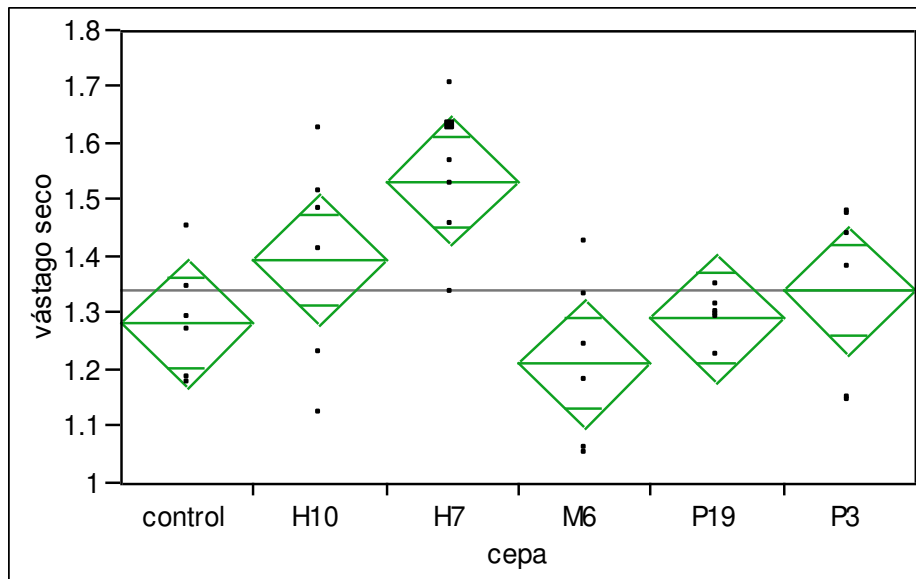
**Figura 3: Análisis de varianza (ANOVA) de la biomasa fresca de las plántulas.**

Los datos están expresados en gramos; los rombos verdes representan el ANOVA y marcan el promedio de los datos (línea verde central del rombo) con su respectiva desviación estándar (líneas de los extremos que dividen el rombo).



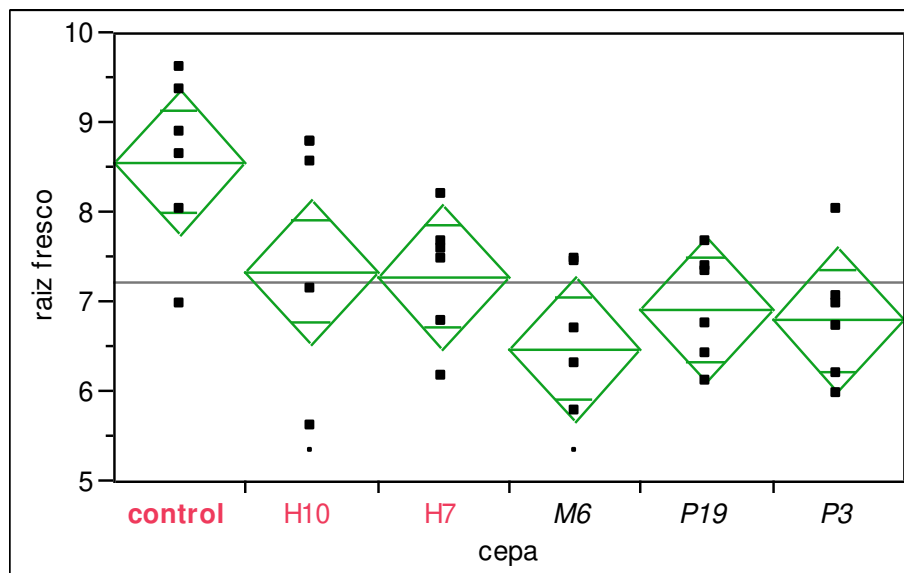
**Figura 4: Análisis de varianza (ANOVA) del vástago fresco de las plántulas.**

Los datos están expresados en gramos; los rombos verdes representan el ANOVA y marcan el promedio de los datos (línea verde central del rombo) con su respectiva desviación estándar (líneas de los extremos que dividen el rombo).



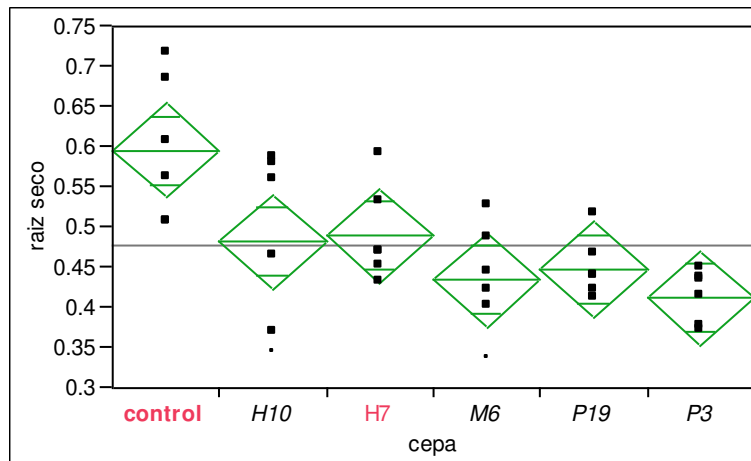
**Figura 5: Análisis de varianza (ANOVA) del vástago seco de las plántulas.**

Los datos están expresados en gramos; los rombos verdes representan el ANOVA y marcan el promedio de los datos (línea verde central del rombo) con su respectiva desviación estándar (líneas de los extremos que dividen el rombo).



**Figura 6: Análisis de varianza (ANOVA) de la raíz fresca de las plántulas.**

Los datos están expresados en gramos; los rombos verdes representan el ANOVA y marcan el promedio de los datos (línea verde central del rombo) con su respectiva desviación estándar (líneas de los extremos que dividen el rombo).



**Figura 7: Análisis de varianza (ANOVA) de la raíz seca de las plántulas.**

Los datos están expresados en gramos; los rombos verdes representan el ANOVA y marcan el promedio de los datos (línea verde central del rombo) con su respectiva desviación estándar (líneas de los extremos que dividen el rombo).

**Tabla 9: Comparación de los resultados obtenidos del escrutinio para los aislados.**

Cepa	Diámetro (cm)	Altura (cm)	Biomasa (g)	Vástago fresco (g)	Vástago seco (g)	Raíz fresca (g)	Raíz seca (g)
H7	1+	3+	1+	1++	1++	2-	-
H10	2+	1+	-	3+	2+	1-	--
M6	-	4+	--	-	-	--	--
P3	3+	-	-	2+	3+	--	--
P19	4+	2+	--	-	4+	--	--

Numeración 1-4, representa los mejores aislados en forma numérica, siendo 1 el valor más alejado del control y el 4 el más cercano al control; +: valor mayor que el control de manera no significativa; ++: valor mayor que el control de manera significativa; -: valor menor que el control de manera no significativa; --: valor menor que el control de manera significativa.

## VII. Discusión

La muestra de humus sólido fue pasteurizada con la intención de seleccionar bacterias capaces de formar estructuras de resistencia, ya que es una característica que les permite sobrevivir en el suelo en caso de que se presenten condiciones adversas asegurando así su permanencia en el mismo. La descripción morfológica nos permite identificar una cepa con la que se va a trabajar y antes de volver a hacer una prueba con ella se puede rectificar su morfología para ver si se sigue trabajando con esta misma cepa o la muestra se ha contaminado.

Husen (2003); Antoun y Prévost (2005) mencionan que el AIA es una auxina que aumenta la producción de pelos radiculares así como de raíces secundarias; efecto que se observa en todos los aislados de la prueba del escrutinio, con excepción de H3. Sin embargo, H3 es el aislado que más  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA produjo. En las pruebas bioquímicas, los rangos de producción de AIA que obtuvimos fueron de  $0.051\text{-}0.95\text{mg L}^{-1}$  que se parece al rango que encontraron Abbas *et al.* (2007) en sus aislados de la rizosfera de trigo ( $0.011\text{-}0.45\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y Ponmurugan & Gopi (2006) ( $0.034\text{--}0.045\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Sin embargo, es una baja producción de AIA si es comparado con el rango de los aislados que obtuvieron Husen (2003) ( $0.36\text{-}5.83\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ); Carcaño-Montiel *et al.* (2006) en aislados de la rizosfera de maíz y teocintle ( $2.00\text{-}49.66\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) así como los obtenidos por Haydee y Reyes (2007) en sus aislados de la rizósfera de lechuga ( $6.8\text{-}20.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

De acuerdo con Husen (2003); Antoun y Prévost (2005) las PSB aumentan el fósforo biodisponible sobre todo en suelos donde se encuentra precipitado, lo que se podría ver reflejado en un mayor peso de materia seca en las plántulas. En las pruebas bioquímicas el rango de solubilización de fosfatos que presentaron los aislados de este estudio ( $6.62\text{-}122.31\text{ mg L}^{-1}$ ) fueron bastante más altos que los que reportaron Ponmurugan & Gopi (2006) ( $0.24\text{--}0.44\text{ mg L}^{-1}$ ).

Bashan y Bashan (2005) concluyeron que el peso seco es el mejor parámetro para determinar el efecto de las PGPR.

El tratamiento que resultó ser mejor que el control en diámetro, altura, biomasa, vástago fresco y seco fue la cepa H7 presentando incluso diferencias significativas en el peso del vástago tanto fresco como seco, sin embargo en las pruebas bioquímicas es la cepa con los valores más bajos tanto de producción de AIA como en la solubilización de  $PO_4$ . En segundo lugar se encuentra la cepa H10 que presentó un diámetro altura, peso del vástago fresco y seco más alto que el control; al igual que la cepa H7, la cepa exhibió valores bajos en la producción de AIA y en la solubilización de  $PO_4$ . La cepa M6 únicamente resultó mejor que el control en la altura, lo cual resulta contrario a los análisis bioquímicos pues esta cepa es la que mayor producción de AIA posee, de las mejores en solubilización de fosfatos y la única que produce sideróforos. La cepa P3 resultó tener un mayor diámetro y un mayor peso en el vástago tanto fresco como seco. Por último la cepa P19 presentó un mayor diámetro, altura y peso seco del vástago. Estas últimas dos cepas presentaron buenos niveles tanto de producción de AIA y de solubilización de  $PO_4$ , sin embargo, ninguna de las dos resultó positiva para las pruebas de fijación de  $N_2$ , ACC-deaminasa ni sideróforos.

Por lo anterior, podríamos atribuirle el efecto promotor de mayor importancia a las capacidades de fijación de  $N_2$  y de la actividad de la enzima ACC-deaminasa. De igual manera, existe la posibilidad de que al haber una menor producción de moléculas por parte de los aislados, también haya una menor demanda de nutrientes por parte de los aislados para con los germinados o las plántulas. Lo que permitiría un mejor desarrollo de la plántula. Sin embargo en condiciones desfavorables para el correcto desarrollo de una plántula, este gasto sería necesario.

## IX. Literatura citada

- Abbas Gh. A., M. A. Seyyed, H. A. Alikhani, I. Allahdadi y M. H. Arzanesh. Isolation and Selection of Indigenous *Azospirillum* spp. and the IAA of Superior Strains Effects on Wheat Roots. 2007. *World Journal of Agricultural Sciences* 3 (4); 523-529.
- Adesemoye A. O.; J. W. Kloepper. Plant-microbes interacciones in enhanced fertilizer-use efficiency. 2009. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1-12.
- Antoun H. y D. Prévost. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. 2005. Z. A. Siddiqui (ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, 1-38.
- Barea J.M., M.J. Pozo, R. Azcón y C. Azcón-Aguilar. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 56.417:1761-1778
- Bashan Y. y L. E. de Bashan. Fresh-weight measurements of roots provide inaccurate estimates of the effects of plant growth-promoting bacteria on root growth: a critical examination. 2005. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 1795-1804
- Bashan Y, y Holguin G. 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol. Biochem.* 30, 1225–1228.
- Bowen G.D., A.D. Rovira. 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy* 66, 1–102.
- Carcaño-Montiel M.G., R. Ferrera-Cerrato, J. Pérez-Moreno, J.D. Molina-Galán y Y. Bashan. 2006. Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. *TERRA Latinoamericana* 24.4:495-502.
- Compant S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clément y E.A. Barka. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71.9:4951-4959
- Dakora F.D. 2003. Defining new roles for plant and rhizobial molecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic legumes. *New Phytol.* 158, 39–49.
- Glickmann E. y Y. Dessaux. 1995. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 61.2:793-796
- Hass D, Keel C. 2003. Regulation of antibiotic production in rootcolonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41, 117–153.
- Haydee B.P. y I. Reyes. 2007. Isolamento e avaliação de bacterias fijadoras de nitrogenio e fosfodisolventes na promoção do crescimento da alface (*Lactuca sativa* L.). *Interciencia.* 32 (8) 561-565.



- Husen E. 2003. Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities in vitro. Indonesian Journal of Agricultural Science 4 (1) 27-31.
- Kibblewhite, M.G., K. Ritz y M. J. Swift. 2007. Soil health in agricultural systems. Phil. Trans. R. Soc. B. 363:685-701.
- Molina P. 2011. Microbiología de la rizosfera de cactáceas que crecen en la Cañada, El Marqués, Querétaro y su potencial biotecnológico. Tesis de Ingeniería Químico Agrícola. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Montgomery C.M. y G.C. Runger. 2003. Applied statistics and probability for engineers (3rd Ed.). John Wiley & Sons, Inc., Arizona.
- Mora A. M. O. 2010. Aislamiento y caracterización de rizo bacterias de suelos agrícolas con potencial de ser empleadas como "Biofertilizantes" en la producción de hortalizas. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma de Querétaro
- Morgan, J.A.W., G.D. Bending y P.J. White. 2005. Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. J. Exp. Bot. Vol. 56, 417: 1729-1739.
- Onofre-Lemus J., I. Hernández-Lucas, L. Girard y J. Caballero-Mellado. 2009. ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in Burkholderia species, and its growth-promoting effect on tomato plants. Appl. Environ. Microbiol. 6581-6590.
- Patten C.L., B.R. Glick. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. Appl. Environ. Microbiol. 68:3795–3801.
- Penrose D.M. y B.R. Glick. 2003. Methods for isolating and characterizing ACCdeaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiol. Plant. 118:10-15.
- Peña H.B., e I. Reyes. 2007. Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). Interciencia 32.8:560-565
- Ponmurugan P. y C. Gopi. 2006. In vitro production of growth regulators and phosphatase activity by phosphate solubilizing bacteria. African Journal of Biotechnology. 5(4) 348-350.
- Ramachandran K., V. Srinivasan, S. Hamza, y M. Anandaraj. 2003. Phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere soil and its growth promotion on black pepper (*Piper nigrum* L.) cuttings. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization.325-331.
- Santillana N., C. Arellano y D. Zúñiga. 2005. Capacidad del Rhizobium de Promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). Ecología Aplicada 4 (12) 47-51.

Sayed R.Z., M.D. Badgujar, H.M. Sonawane, M.M. Mhaske y S.B. Chincholkar. 2004. Production of microbial iron chelators (siderophores) by fluorescent Pseudomonads. Indian J. Biot. 4:484-490

Sprent JI. 2002. Nodulation in legumes. Royal Botanic Gardens, Kew, RU.

Toal M.E, Yeomans C, Killham K, Meharg A.A. 2000.A review of rhizosphere carbon flow modelling. Plant and Soil 222, 263–281.

Whipps JM. 2004. Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. Can. J. Bot. 82, 1198–1227.

Zahir ZA, Arshad M, Frankenberger WT. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. Adv. Agro. 81:97–168.