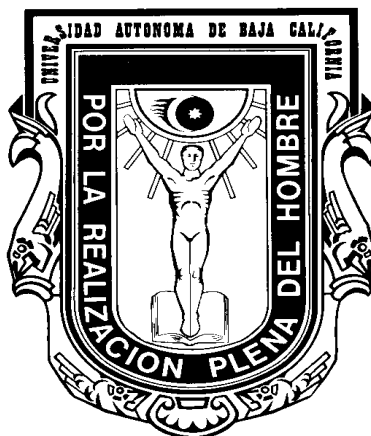


Universidad Autónoma de Baja California
Instituto de Ciencias Agrícolas



**DETECCIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO DE
PLANTAS AUTÓCTONAS DEL DESIERTO DE ALTAR, Y SU EFECTO EN
MEZQUITE CHILENO (*Prosopis chilensis*)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA:

JORGE ARNOLDO VILLEGAS ESPINOZA

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Edgar Omar Rueda Puente

Mexicali, Baja California, México

Diciembre de 2009

La presente tesis titulada “**Detección de bacterias promotoras de crecimiento de plantas autóctonas del desierto de Altar, y su efecto en mezquite chileno (*Prosopis chilensis*)**”, realizada por el **M.C. Jorge Arnoldo Villegas Espinoza**; fue dirigida y asesorada por el **Dr. Edgar Omar Rueda Puente**, siendo aceptada, revisada y aprobada por el Consejo Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Consejo Particular

Dr. EDGAR OMAR RUEDA PUENTE
DIRECTOR DE TESIS

Dr. ONÉCIMO GRIMALDO JUÁREZ
CO-DIRECTOR DE TESIS

Dra. MARÍA ESTHER PUENTE
SINODAL

Dr. BERNARDO MURILLO AMADOR
SINODAL

Dra. SILVIA MÓNICA AVILES MARÍN
SINODAL

DEDICATORIA

A mi madre Amalia le dedico este trabajo tan importante para mí.

¡Gracias madre! por todo el apoyo que me has brindado.

También al amor de mi vida Carmen, por el apoyo tan importante que me has otorgado en el transcurso de mi investigación de tesis Doctoral.

También a Dios por darme la vida y la oportunidad de realizar esta investigación y obtener el grado de Doctor en Ciencias Agrícolas.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Baja California.

Al Instituto de Ciencias Agrícolas (ICA), por las facilidades otorgadas para desarrollar el programa de doctorado.

Gracias por el apoyo otorgado a un servidor por parte de los doctores del ICA, Dr. Onecimo Grimaldo Juárez y la Dra. Silvia Mónica Aviles Marín. A todos los maestros ¡Gracias por el apoyo especial que se me ha otorgado!. Siempre los tendré presente.

También agradezco al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), por su valiosa participación dentro de la realización de esta investigación y el apoyo otorgado de los doctores: Dra. María Esther Puente y el Dr. Bernardo Murillo Amador.

También gracias al Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Baja California por su colaboración en prestamos de instalación y equipo.

Se agradece el apoyo de la beca doctoral (CVU: 206653), otorgado a un servidor por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Se agradece al Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo (CIAD), ubicado en la cd. de Hermosillo, Sonora, México. Especialmente a el Dr. Gustavo González Aguilar y el Dr. Fernando Ayala Zavala, por la coordinación de la Estancia de investigación de doctorado en el periodo Enero-Julio de 2009.

Se agradece al Laboratorio Agrícola “Dr. Félix Ayala Chairez” de la División de Ciencias Administrativas, Contables y Agropecuarias de la Universidad de Sonora, Campus Santa Ana, por la estancia de investigación.

También se agradece a la Universidad de Sonora Unidad Regional Norte Campus Caborca, Sonora por la realización de los análisis de suelo y al responsable del laboratorio de suelos, M. C. Beatriz Elena Arias Tobin.

También le doy mi agradecimiento al Dr. Edgar Omar Rueda Puente por la confianza y apoyo en la investigación de búsqueda de conocimiento en el tema de bacterias promotoras de crecimiento de plantas y motivación en seguir adelante.

A mis compañeros de doctorado:

Jesús Borboa Flores y Armando Pulido Herrera por el apoyo otorgado como compañeros de estudio y por su valiosa ayuda en conocimiento hacia un servidor, nunca los olvidaré y siempre estarán en mi pensamiento ¡Gracias amigos!, la vida me premió en tenerlos a mi lado.

A mis amigos muchas gracias por su apoyo y motivación en los momentos felices y difíciles que pasamos juntos. ¡A ellos, Gracias!.

Finalmente se agradece al Proyecto de Fondo sectorial para la investigación (CONACYT-CONAFOR) clave 14651, por el apoyo recibido para el desarrollo de la presente investigación y estancia aprobada del Dr. Bernardo Murillo Amador en Apoyos Complementarios para la Consolidación Institucional de Grupos de Investigación (Repatriación, Retención y Estancias de Consolidación)- 2007, quien fungió como asesor de la presente investigación.

ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE CUADROS.....	xviii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	11
2.1. <i>El género Prosopis spp.: el mezquite</i>.....	11
2.1.1. <i>Usos y propiedades</i>.....	13
2.1.2. <i>Descripción botánica del mezquite (Prosopis spp.)</i>.....	14
3. <i>Prosopis chilensis: mezquite chileno</i>	16
3.1. <i>La germinación</i>	16
3.2. <i>Problemas de la germinación en halófitas</i>.....	19
4. <i>Microorganismos benéficos para el crecimiento y desarrollo de las plantas</i>	21
4.1. <i>Microorganismos fijadores de nitrógeno</i>.....	21
4.2. <i>Asociaciones ecológicas que se establecen entre los microorganismos del suelo</i>.....	22
4.3. <i>Fijación de nitrógeno</i>.....	25
4.4. <i>Importancia de los microorganismos fijadores de nitrógeno</i>.....	26

5. Bacterias promotoras de crecimiento de plantas (BPCP).....	27
5.1. Azospirillum spp.: un género bacteriano promotor del crecimiento vegetal (Importancia, distribución y aislamiento).....	29
6. Rizósfera y filosfera.....	33
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
7.1. Muestreo de suelo y rizósfera de mezquite (Prosopis glandulosa).....	35
7.2. Aislamiento de microorganismos asociados a la rizósfera de Prosopis glandulosa.....	36
7.3. Muestreo para análisis físico-químico de suelo fuera del dosel de mezquite.....	37
7.4. Determinación de la capacidad de fijación de nitrógeno por las bacterias aisladas.....	38
7.5. Caracterización por 16S rRNA de los potenciales aislados bacterianos.....	39
7.6. Cinética bacteriana de aislados bacterianos potenciales bajo condiciones de salinidad y temperatura.....	40
7.7. Pruebas de degradación mineral y solubilización de fosfatos inorgánicos por bacterias de rizoplasma.....	40
7.8. Producción de ácidos orgánicos por Bacillus amyloliquefaciens aislada de rizósfera de mezquite (Prosopis glandulosa).....	41
8. Estudio in vitro	41
8.1. Colecta de la semilla de Prosopis glandulosa.....	41
8.2. Pruebas de germinación.....	42
8.3. Longitud radicular y altura de plántula.....	44
8.4. Peso fresco de plántula de mezquite chileno (Prosopis chilensis).....	44

8.5. Cuantificación de células bacterianas (Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) adheridas al sistema radicular de plantas de <i>P. chilensis</i>	44
9. Estudio en invernadero.....	45
9.1. Longitud radicular de plántula y altura de planta.....	47
9.2. Peso fresco y Peso seco de plántula.....	47
9.3. Cuantificación de células bacterianas adheridas al sistema radicular de plantas de <i>P. chilensis</i>	47
9.4. Análisis bromatológicos.....	48
10. RESULTADOS.....	49
10.1. Aislamiento de microorganismos asociados a la rizósfera de <i>Prosopis glandulosa</i>	49
10.2. Conservación y preservación de los aislados de raíz y suelo de mezquite (<i>Prosopis glandulosa</i>).....	52
10.3. Muestreo para análisis de suelo fuera del dosel de mezquite.....	52
10.4. Determinación de la capacidad de fijación de nitrógeno por las bacterias aisladas.....	56
10.5. Caracterización de los potenciales aislados bacterianos mediante 16S rRNA.....	57
10.6. Cinética bacteriana de aislados potenciales bajo condiciones de salinidad y temperatura.....	60
10.7. Pruebas de degradación mineral y solubilización de fosfatos inorgánicos por bacterias de rizoplaneo.....	62
10.8. Producción de ácidos orgánicos por bacterias aisladas de rizósfera de mezquite (<i>Prosopis glandulosa</i>).....	64
11. Estudio in vitro	65
11.1. Germinación in vitro a un tiempo de escarificación de 0 minutos.....	65

11.2. Tasa de germinación a un tiempo de escarificación de 0 minutos.....	65
11.3. Longitud radicular y altura de plántula a un tiempo de escarificación de 0 minutos.....	69
11.4. Peso fresco de plántula de mezquite chileno (<i>Prosopis chilensis</i>) a un tiempo de escarificación de 0 minutos.....	69
11.5. Cuantificación de células bacterianas (Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) adheridas al sistema radicular de plantas de <i>P. chilensis</i> con un tiempo de escarificación de 0 minutos.....	69
12. Germinación in vitro a un tiempo de escarificación de 2 minutos.....	71
12.1. Tasa de germinación a un tiempo de escarificación de 2 minutos.....	71
12.2. Longitud radicular y altura de plántula a un tiempo de escarificación de 2 minutos.....	74
12.3. Peso fresco de plántula de mezquite chileno (<i>Prosopis chilensis</i>) a un tiempo de escarificación de 2 minutos.....	74
12.4. Cuantificación de células bacterianas (Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) adheridas al sistema radicular de plantas de <i>P. chilensis</i> con un tiempo de escarificación de 2 minutos.....	74
13. Germinación in vitro a un tiempo de escarificación de 4 minutos.....	76
13.1. Tasa de germinación a un tiempo de escarificación de 4 minutos.....	76
13.2. Longitud radicular y altura de plántula a un tiempo de escarificación de 4 minutos.....	80
13.3. Peso fresco de plántula de mezquite chileno (<i>Prosopis chilensis</i>) a un tiempo de escarificación de 4 minutos.....	80
13.4. Cuantificación de células bacterianas (Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) adheridas al sistema radicular de plantas de <i>P. chilensis</i> con un tiempo de escarificación de 4 minutos.....	81

14. Germinación in vitro a un tiempo de escarificación de 6 minutos.....	83
14.1. Tasa de germinación a un tiempo de escarificación de 6 minutos.....	83
14.2. Longitud radicular y altura de plántula a un tiempo de escarificación de 6 minutos.....	86
14.3. Peso fresco de plántula de mezquite chileno (<i>Prosopis chilensis</i>) a un tiempo de escarificación de 6 minutos.....	86
14.4. Cuantificación de células bacterianas (Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) adheridas al sistema radicular de plantas de <i>P. chilensis</i> con un tiempo de escarificación de 6 minutos.....	87
15. Germinación in vitro a un tiempo de escarificación de 8 minutos.....	88
15.1. Tasa de germinación a un tiempo de escarificación de 8 minutos.....	88
15.2. Longitud radicular y altura de plántula a un tiempo de escarificación de 8 minutos.....	91
15.3. Peso fresco de plántula de mezquite chileno (<i>Prosopis chilensis</i>) a un tiempo de escarificación de 8 minutos.....	91
15.4. Cuantificación de células bacterianas (Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) adheridas al sistema radicular de plantas de <i>P. chilensis</i> con un tiempo de escarificación de 8 minutos.....	91
16. Estudio en invernadero.....	93
16.1. Pruebas de emergencia a un tiempo de escarificación de 0 minutos.....	93
16.2. Tasa de emergencia a un tiempo de escarificación de 0 minutos.....	93
16.3. Altura de planta, longitud radicular, peso fresco de planta, peso seco de planta, peso fresco y seco de raíz; unidades formadoras de colonias (UFC/mL) a un tiempo de escarificación de 0 minutos.....	96

17. Prueba de emergencia a un tiempo de escarificación de 2 minutos.....	98
17.1. Tasa de emergencia a un tiempo de escarificación de 2 minutos.....	98
17.2. Altura de planta, longitud radicular, peso fresco de planta, peso seco de planta, peso fresco y seco de raíz; unidades formadoras de colonias (UFC/mL) a un tiempo de escarificación de 2 minutos.....	101
18. Pruebas de emergencia a un tiempo de escarificación de 4 minutos.....	103
18.1. Tasa de emergencia a un tiempo de escarificación de 4 minutos.....	103
18.2. Altura de planta, longitud radicular, peso fresco de planta, peso seco de planta, peso fresco y seco de raíz; unidades formadoras de colonias (UFC/mL) a un tiempo de escarificación de 4 minutos.....	106
18.3. Análisis bromatológicos a un tiempo de escarificación de 4 minutos.....	108
19. Pruebas de emergencia a un tiempo de escarificación de 6 minutos.....	109
19.1. Tasa de emergencia a un tiempo de escarificación de 6 minutos.....	109
19.2. Altura de planta, longitud radicular, peso fresco de planta, peso seco de planta, peso fresco y seco de raíz; unidades formadoras de colonias (UFC/mL) a un tiempo de escarificación de 6 minutos.....	112
20. Pruebas de emergencia a un tiempo de escarificación de 8 minutos.....	114
20.1. Tasa de emergencia a un tiempo de escarificación de 8 minutos.....	114
20.2. Altura de planta, longitud radicular, peso fresco de planta, peso seco de planta, peso fresco y seco de raíz; unidades formadoras de colonias (UFC/mL) a un tiempo de escarificación de 8 minutos.....	117

21. DISCUSIÓN	119
22. CONCLUSIONES.....	128
23. LITERATURA CITADA.....	130

24. ANEXOS	142
-------------------	------------

Cartel publicado

12th Simposio Internacional de Ecología Microbiana en Cairns, Australia	
25. FIRST REPORT OF PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA FROM MESQUITE (<i>Prosopis</i> spp.) RHIZOSPHERE FROM VOLCANS OF SONORA DESERT.....	143

Artículos publicados y enviados en revistas indexadas

REVISTA UNIVERSIDAD Y CIENCIA

26. Isolation of plant growth promoting bacteria from mesquite (<i>Prosopis glandulosa</i>) rhizosphere on volcanos of Sonora desert. Aislamiento de bacterias promotoras de crecimiento de plantas de la rizósfera de mezquite (<i>Prosopis glandulosa</i>), en volcanes del desierto de Sonora.....	145
--	-----

REVISTA TROPICAL AND SUBTROPICAL AGROECOSYSTEMS

27. EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE <i>Azospirillum halopraeferens</i> Y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> EN LA GERMINACIÓN DE <i>Prosopis chilensis</i> . EFFECT OF THE INOCULATION OF <i>Azospirillum halopraeferens</i> and <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IN GERMINATION OF <i>Prosopis chilensis</i>	146
Fecha de publicación 2010	

REVISTA INTERCIENCIA

28. EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE <i>Azospirillum halopraeferens</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> EN LA EMERGENCIA DE <i>Prosopis chilensis</i> . EFFECT OF THE INOCULATION OF <i>Azospirillum halopraeferens</i> and <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IN EMERGENCY OF <i>Prosopis chilensis</i>	147
--	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	Pág.
1	Cromatograma mostrando la actividad de reducción de acetileno de la bacteria asociada a <i>Prosopis glandulosa</i> comparandola con <i>Azospirillum halopraeferens</i>	57
2	Identificación del 16S rRNA de la bacteria fijadora de nitrógeno aislada de la rizósfera de <i>Prosopis glandulosa</i> que presentó una colonia blanca.....	58
3	Identificación del 16S rRNA de la bacteria fijadora de nitrógeno aislada de la rizósfera de <i>Prosopis glandulosa</i> que presentó una colonia rosa.....	59
4	Identificación del 16S rRNA de la bacteria fijadora de nitrógeno aislada de la rizósfera de <i>Prosopis glandulosa</i> que presentó una colonia naranja.....	59
5	Identificación del 16S rRNA de la bacteria fijadora de nitrógeno aislada de la rizósfera de <i>Prosopis glandulosa</i> que presentó una colonia amarilla.....	60
6	Solubilización de fosfatos de aislamientos bacterianos de rizósfera de <i>Prosopis glandulosa</i> sobre medio Henderson y Duff (1963).....	63
7	Solubilización de fosfatos de aislamientos bacterianos de rizósfera de <i>Prosopis glandulosa</i> sobre medio SRSM donde se ve el cambio de color.....	63
8	Porcentaje de germinación (%) de <i>Prosopis chilensis</i> con tiempo de escarificación de 0 minutos, (CHI= semilla de mezquite chileno, CONT=control, inoculantes AH= <i>Azospirillum halopraeferens</i> , BA= <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>), bajo cuatro concentraciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M), las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).....	67
9	Efecto de la Tasa de emergencia (%) de <i>Prosopis chilensis</i> , por <i>Azospirillum halopraeferens</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , con su respectivo control sin inoculante bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), a un tiempo de escarificación de cero minutos; las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).....	68

10	Porcentaje de germinación (%) de <i>Prosopis chilensis</i> con tiempo de escarificación de 2 minutos, (CHI= semilla de mezquite chileno, CONT=control, inoculantes AH= <i>Azospirillum halopraeferens</i> , BA= <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>), bajo cuatro concentraciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M), las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).....	72
11	Efecto de la Tasa de germinación (%) de <i>Prosopis chilensis</i> , por <i>Azospirillum halopraeferens</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , con su respectivo control sin inoculante bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), a un tiempo de escarificación de dos minutos, las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).....	73
12	Porcentaje de germinación (%) de <i>Prosopis chilensis</i> con tiempo de escarificación de 4 minutos, (CHI= semilla de mezquite chileno, CONT=control, inoculantes AH= <i>Azospirillum halopraeferens</i> , BA= <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>), bajo cuatro concentraciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M), las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).....	78
13	Efecto de la Tasa de germinación (%) de <i>Prosopis chilensis</i> , por <i>Azospirillum halopraeferens</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , con su respectivo control sin inoculante bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), a un tiempo de escarificación de cuatro minutos; las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).....	79
14	Porcentaje de germinación (%) de <i>Prosopis chilensis</i> con tiempo de escarificación de 6 minutos, (CONT=control, CHI= semilla de mezquite chileno, inoculantes AH= <i>Azospirillum halopraeferens</i> , BA= <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>), bajo cuatro concentraciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M), las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).....	84
15	Efecto de la Tasa de germinación (%) de <i>Prosopis chilensis</i> , por <i>Azospirillum halopraeferens</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , con su respectivo control sin inoculante bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), a un tiempo de escarificación de seis minutos; las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).....	85

16	Porcentaje de germinación (%) de <i>Prosopis chilensis</i> con tiempo de escarificación de 8 minutos, (CONT=control, CHI= semilla de mezquite chileno, inoculantes AH= <i>Azospirillum halopraeferens</i> , BA= <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>), bajo cuatro concentraciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M), las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).....	89
17	Efecto de la Tasa de germinación (%) de <i>Prosopis chilensis</i> , por <i>Azospirillum halopraeferens</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , con su respectivo control sin inoculante bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), a un tiempo de escarificación de ocho minutos, las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).....	90
18	Efecto ejercido en el porcentaje de emergencia final (%) por <i>Azospirillum halopraeferens</i> =AH y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> =BA, con su respectivo control=CONT sin inoculante, bajo condiciones de invernadero y con cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl). A un tiempo de escarificación de la semilla de <i>Prosopis chilensis</i> de cero minutos; literales muestran diferencia significativa ($P < 0.05$).....	94
19	Efecto de la Tasa de emergencia (%) de <i>Prosopis chilensis</i> , por <i>Azospirillum halopraeferens</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , con su respectivo control sin inoculante bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), a un tiempo de escarificación de cero minutos; las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).....	95
20	Efecto ejercido en el porcentaje de emergencia final (%) por <i>Azospirillum halopraeferens</i> =AH y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> =BA, con su respectivo control=CONT sin inoculante, bajo condiciones de invernadero y con cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl). A un tiempo de escarificación de la semilla de <i>Prosopis chilensis</i> de dos minutos, literales muestran diferencia significativa ($P < 0.05$).....	99
21	Efecto de la Tasa de germinación (%) de <i>Prosopis chilensis</i> , por <i>Azospirillum halopraeferens</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , con su respectivo control sin inoculante bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), a un tiempo de escarificación de dos minutos, las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).....	100

22	Efecto ejercido en el porcentaje de emergencia final (%) por <i>Azospirillum halopraeferens</i> =AH y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> =BA, con su respectivo control=CONT sin inoculante, bajo condiciones de invernadero y con cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl). A un tiempo de escarificación de la semilla de <i>Prosopis chilensis</i> de cuatro minutos, literales muestran diferencia significativa ($P < 0.05$).....	104
23	Efecto de la Tasa de germinación (%) de <i>Prosopis chilensis</i> , por <i>Azospirillum halopraeferens</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , con su respectivo control sin inoculante bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), a un tiempo de escarificación de cuatro minutos; las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).....	105
24	Efecto ejercido en el porcentaje de emergencia final (%) por <i>Azospirillum halopraeferens</i> =AH y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> =BA, con su respectivo control=CONT sin inoculante, bajo condiciones de invernadero y con cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl). A un tiempo de escarificación de la semilla de <i>Prosopis chilensis</i> de seis minutos; literales muestran diferencia significativa ($P < 0.05$).....	110
25	Efecto de la Tasa de germinación (%) de <i>Prosopis chilensis</i> , por <i>Azospirillum halopraeferens</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , con su respectivo control sin inoculante bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), a un tiempo de escarificación de seis minutos; las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).....	111
26	Efecto ejercido en el porcentaje de emergencia final (%) por <i>Azospirillum halopraeferens</i> =AH y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> =BA, con su respectivo control=CONT sin inoculante, bajo condiciones de invernadero y con cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl). A un tiempo de escarificación de la semilla de <i>Prosopis chilensis</i> de ocho minutos, literales muestran diferencia significativa ($P < 0.05$).....	115

27	Efecto de la Tasa de germinación (%) de <i>Prosopis chilensis</i> , por <i>Azospirillum halopraeferens</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , con su respectivo control sin inoculante bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), a un tiempo de escarificación de ocho minutos, las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$)......	116
----	--	-----

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	TÍTULO	Pág.
1	Colonias bacterianas aisladas de rizósfera de mezquite (<i>Prosopis glandulosa</i>) bajo cuatro concentraciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M).....	49
2	Colonias bacterianas aisladas de rizósfera de mezquite (<i>Prosopis glandulosa</i>) bajo cuatro concentraciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M).....	50
3	Colonias bacterianas aisladas de suelo de mezquite (<i>Prosopis glandulosa</i>) bajo cuatro concentraciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M).	51
4	Colonias bacterianas de suelo y rizósfera puestas en conservación, bajo condiciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M).....	52
5	Análisis físico químico del suelo obtenido en mezquite (<i>Prosopis glandulosa</i>) dentro y fuera del dosel del mezquite.....	55
6	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Kocuria polaris</i> , <i>Planococcus antarcticus</i> y <i>Rhodococcus fascians</i> sometidas a dos pruebas de temperatura y cuatro concentraciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M).....	61
7	Solubilización de fosfatos de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Rhodococcus fascians</i> , <i>Kocuria polaris</i> y <i>Planococcus artarcticus</i> , en medio de cultivo SRSM, bajo condiciones de salinidad (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl) y dos temperaturas (30 y 50° C).....	64
8	Efecto de la inoculación de <i>Azospirillum halopraeferens</i> =AH y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> =BA, y su respectivo control=C sin inoculante en plántulas de <i>Prosopis chilensis</i> , bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), con un tiempo de escarificación de la semilla de <i>Prosopis chilensis</i> de cero minutos.....	70

9	Efecto de la inoculación de <i>Azospirillum halopraeferens</i> =AH y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> =BA, y su respectivo control=C sin inoculante en plántulas de <i>Prosopis chilensis</i> , bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), con un tiempo de escarificación de la semilla de <i>Prosopis chilensis</i> de dos minutos.....	75
10	Efecto de la inoculación de <i>Azospirillum halopraeferens</i> =AH y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> =BA, y su respectivo control=C sin inoculante en plántulas de <i>Prosopis chilensis</i> , bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), con un tiempo de escarificación de la semilla de <i>Prosopis chilensis</i> de cuatro minutos.....	82
11	Efecto de la inoculación de <i>Azospirillum halopraeferens</i> =AH y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> =BA, y su respectivo control=C sin inoculante en plántulas de <i>Prosopis chilensis</i> , bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), con un tiempo de escarificación de la semilla de <i>Prosopis chilensis</i> de seis minutos.....	87
12	Efecto de la inoculación de <i>Azospirillum halopraeferens</i> =AH y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> =BA, y su respectivo control=C sin inoculante en plántulas de <i>Prosopis chilensis</i> , bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), con un tiempo de escarificación de la semilla de <i>Prosopis chilensis</i> de ocho minutos.....	92
13	Efecto de la inoculación de <i>Azospirillum halopraeferens</i> =AH y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> =BA, y su respectivo control=C sin inoculante en plántulas de <i>Prosopis chilensis</i> , bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), con un tiempo de escarificación de la semilla de <i>Prosopis chilensis</i> de cero minutos.....	97

14	Efecto de la inoculación de <i>Azospirillum halopraeferens</i> =AH y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> =BA, y su respectivo control=C sin inoculante en plántulas de <i>Prosopis chilensis</i> , bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), con un tiempo de escarificación de la semilla de <i>Prosopis chilensis</i> de dos minutos.....	102
15	Efecto de la inoculación de <i>Azospirillum halopraeferens</i> =AH y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> =BA, y su respectivo control=C sin inoculante en plántulas de <i>Prosopis chilensis</i> , bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), con tiempo de escarificación de la semilla de <i>Prosopis chilensis</i> de cuatro minutos.....	107
16	Efecto de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y <i>Azospirillum halopraeferens</i> en contenidos totales de lípidos, proteínas y ceniza en plantas de <i>Prosopis chilensis</i> bajo cuatro concentraciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M).....	108
17	Efecto de la inoculación de <i>Azospirillum halopraeferens</i> =AH y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> =BA, y su respectivo control=C sin inoculante en plántulas de <i>Prosopis chilensis</i> , bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), con un tiempo de escarificación de la semilla de <i>Prosopis chilensis</i> de seis minutos,.....	113
18	Efecto de la inoculación de <i>Azospirillum halopraeferens</i> =AH y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> =BA, y su respectivo control=C sin inoculante en plántulas de <i>Prosopis chilensis</i> , bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), con un tiempo de escarificación de la semilla de <i>Prosopis chilensis</i> de ocho minutos.....	118

RESUMEN

Algunas zonas áridas y semiáridas en nuestro país México, han sido perturbadas por la actividad del hombre para obtener un bien económico como la utilización de carbón, leña y expandir tierras para uso agrícola, por esta razón se esta utilizando la reforestación con la planta de mezquite para áreas dañadas; la importancia ecológica del mezquite juega un papel importante en el medio ambiente como planta fijadora de nitrógeno, enriquece el suelo a su alrededor, promueve el crecimiento de matorrales asociados a ella y por tanto previene la erosión del suelo; así mismo, actúa como planta nodriza de numerosas especies de aves y roedores. Para esta investigación, se propone la utilización del mezquite chileno (*Prosopis chilensis*), con la interacción de Bacterias Promotoras de Crecimiento de Plantas (BPCP); este tipo de microorganismos rizosféricos son benéficos ya que dichas bacterias entre algunas propiedades, pueden fijar el nitrógeno atmosférico y otórgalo a las plantas. También sintetizan fitohormonas que aprovechan las plantas y pueden fungir como biocontrol hacia patógenos que dañan a las plantas. Adicionalmente, hacen que la planta adquiera tolerancia al estrés, tales como sequía, alta salinidad, metales tóxicos y pesticidas. La utilización de BPCP, pueden ser utilizadas para reducir la fertilización química, ya que la fertilización química, incrementa la salinidad y viene a dañar el suelo, subsuelo y mantos acuíferos. En base a lo anterior, se llevaron a cabo los siguientes objetivos: a) Aislar, purificar e identificar bacterias promotoras de crecimiento de plantas (BPCP), asociadas a rizósfera del mezquite sonorense (*Prosopis glandulosa*), en el desierto de Altar, Sonora. b)

Cuantificar la actividad enzimática de la nitrogenasa responsable de la fijación de nitrógeno. c) Evaluar el efecto promotor del crecimiento de plantas de mezquite (*Prosopis chilensis*) utilizando los aislados bacterianos nativos de *P. glandulosa*, en experimentos de inoculación en semilla y desarrollo de plantas *in vitro*, y en invernadero. Bajo condiciones de laboratorio se evaluó el porcentaje de germinación, tasa de germinación, altura de plántula, longitud radicular, peso fresco de plántula, número de células bacterianas adheridas al sistema radicular. Bajo condiciones de invernadero, las variables evaluadas fueron porcentaje de emergencia, tasa de emergencia, altura de plántula y longitud radicular, peso fresco y seco de planta, peso fresco y seco de raíz, número de células bacterianas adheridas al sistema radicular y análisis bromatológicos.

Se obtuvieron 19 aislados bacterianos, de los cuales se seleccionaron cuatro, que presentaron mejor capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, los cuales fueron identificados por el 16S rRNA: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Kocuria polaris*, *Planococcus antarticus* y *Rhodococcus fascians*, siendo *Bacillus amyloliquefaciens* el microorganismo que resultó ser eficiente en la Fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos y crecimiento a baja y alta temperatura y de salinidad. Los resultados indican que, al evaluar *Bacillus amyloliquefaciens* en condiciones *in vitro*, comparada con el control *Azospirillum halopraeferens*, el porcentaje y tasa de germinación disminuyó conforme la salinidad se incrementa. Sin embargo, estas variables fueron favorecidas positivamente por la inoculación de *A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens*; la altura de plántula y longitud radicular fueron incrementadas con la bacteria *B. amyloliquefaciens*, en

las salinidades (0, 0.25 y 0.5 M de NaCl). Cabe indicar que lo anterior fue mostrado considerando inmersiones de semilla en agua hirviendo (100 °C) durante 4 y 6 minutos. Por otra parte, los resultados obtenidos en invernadero, muestran que las variables evaluadas como porcentaje y tasa de emergencia, altura de plántula, longitud radicular, peso fresco y seco de plántula y raíz, fueron incrementados en un 50% con la inoculación de *A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens*, siempre y cuando el periodo de escarificación se de entre los 4 y 6 minutos. Un similar comportamiento al de *in vitro*, fue observado en invernadero que las variables son reducidas conforme se incrementa la concentración salina. Por lo anterior, el presente estudio muestra y confirma que la asociación de bacterias benéficas asociadas a la rizósfera de *Prosopis glandulosa*, es un aporte a la investigación sobre la detección de bacterias promotoras de crecimiento vegetal con posible potencial agrícola-forestal, y donde es necesario conocer la influencia positiva sobre las plantas.

Palabras clave: fijación de nitrógeno, *Bacillus amyloliquefasciens*, *Prosopis chilensis*, *Azospirillum halopraeferens*, salinidad.

ABSTRACT

Some dry and semi-arid zones in our Mexico country, have been disturbed by the activity of the man to obtain economic beneficial from the use of coal, firewood and expander earth for agricultural use, for above the use the reforestation with the plants like a mesquite for damaged areas. The ecological importance of mesquite, plays an important role on the environment due its plants help to nitrogen fixing, also it enriches the ground to his around, promotes the growth of scrubs associated to her and therefore prevents the erosion with the ground; also it acts to help numerous species of birds and rodents. For this research, the use of mesquite chileno (*Prosopis chilensis*), with the interaction of Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB), due this kind of microorganisms are beneficial because they synthesize phytohormones that take advantage of the plants and can act like biocontrol towards pathogens that they damage to the plants. The use of PGPB is for reducing the chemical fertilization, due the chemical fertilization increases the salinity and it comes has to damage soil, subsoil and the water-bearing ground. On the basis of the previous thing the following objectives were carried out: a) To isolate, to purify and to identify Plant Growth Promoting Bacteria, associated to rhizosphere of mesquite sonorensis (*Prosopis glandulosa*). b) To quantify the enzymatic activity of nitrogenase responsible for the nitrogen fixation. c) To evaluate the promotional effect of the growth of plants of mesquite (*Prosopis chilensis*) by means of these bacteria in experiments of inoculation in seed and development of plants *in vitro*, and in greenhouse. Under laboratory conditions was evaluated: germination

percentage, germination rate, height of seedling, root length, fresh weight of plant. Under conditions of greenhouse, the evaluated variables were: percentage of emergency, emergency rate, height and length to radicle, fresh and dry weight of plant, fresh and dry weight by root, number of bacterial cells adhered to the root system and bromatological analyses.

19 bacterial isolates were obtained, which then were selected four that displayed better to fix nitrogen and those four isolated were identified by 16S rRNA: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Kocuria polaris*, *Planococcus antarcticus* and *Rhodococcus fascians*. *Bacillus amyloliquefaciens* was the best microorganism to fix nitrogen and phosphates solubilize and growth under high temperature and salinity. To another hand, the results when *Bacillus amyloliquefaciens* was evaluated *in vitro* conditions, compared with the control *Azospirillum halopraeferens*, the germination percentage and germination was diminished as the salinity increases. Nevertheless, these variables were favored positively by the inoculation of *A. halopraeferens* and *B. amyloliquefaciens*; the heights of seedling and root length were increased by *B. amyloliquefaciens*, in the salinities (0, 0.25 and 0.5 M of NaCl). It is worth mentioning that the previous thing was considering the immersion of seed in boiling water (100 °C) during 4 and 6 minutes. On the other hand, the results obtained in greenhouse, showed that the variables evaluated as percentage and rate of emergency, height of seedling, root length, fresh and dry weight of seedling and root were increased in 50 % by the inoculation of *A. halopraeferens* and *B. amyloliquefaciens*, at 4 and 6 minutes of scarification. A similar behavior *in vitro*, was observed in greenhouse where

the variables were reduced as the saline concentration was increased. For above, the present study shows and confirms that the bacteria associated with the rhizosphere of *Prosopis glandulosa*, is a contribution to the research about the detection of plant growth promoting bacteria with possible agricultural- forest potential, and where it is necessary to know the positive influence on the plants.

Key words: nitrogen fixing, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Prosopis chilensis*, *Azospirillum halopraeferens*, salinity.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se están perturbando comunidades de plantas naturales por la acción del hombre, hay que tener una comprensión cada vez mayor de los mecanismos que funcionan en ecosistemas naturales para poder manejar áreas dañadas y como también restaurar y estabilizar el medio ambiente. El estado de Sonora y la península de Baja California, son uno de los estados áridos de México, con 80 mm precipitación anual, además de carecer de recursos hídricos superficiales. La reproducción y reforestación son actividades que dependen de agua subterránea y de pozos. Desafortunadamente, la extracción de agua, supera al índice de mantos acuíferos, y el uso inadecuado de fertilizantes ha causado aumentos en la salinidad, que durante las dos décadas pasadas se convirtió en un problema grave en la reproducción de árboles tradicionales en estas regiones (García, 1988; Mas et al., 2002).

El interés ecológico del mezquite (*Prosopis* spp), radica en el medio ambiente como planta fijadora de nitrógeno, enriquece el suelo a su alrededor, promueve el crecimiento de matorrales asociados a ella y por tanto previene la erosión del suelo; así mismo actúa como planta nodriza de numerosas especies de aves y roedores (Rzedowski, 1983; Heiseke, 1984; Golubov et al., 2001). Un género representativo de reproducción en zonas áridas es *Prosopis* L. (Fabaceae) que constituye un recurso muy importante en muchas regiones áridas y semiáridas del mundo. Estos árboles son potencialmente importantes ya que se pueden incorporar dentro de viveros para reproducirlos, restaurar y estabilizar áreas afectadas por la salinidad y las zonas perturbadas por el ser

humano. En otras partes, realmente hay un interés cada vez mayor sobre los efectos de la remediación sobre una gama de niveles de sal en los suelos. En el estado de Baja California y Sonora, *Prosopis* spp., tiene una distribución amplia (López-Franco et al., 2006).

Se ha identificado este árbol como recurso para establecerlo en comunidades del desierto del Sonora. Se considera un árbol de aplicaciones múltiples por que sus ramas y hojas son muy apetecidas por el ganado y herbívoros silvestres, ya que poseen un alto valor nutritivo utilizándose como complemento en la dieta, contienen entre 13.5-18.3% de proteínas, 19.9% de fibras y alrededor del 10% de cenizas. Los frutos presentan los siguientes contenidos orgánicos: 57.4% de sacarosa, 30.8% de mucílagos, 7.6-10.2% de proteínas, 26% de fibras, 3.4-4.5% de cenizas, 1.65- 2% de rutina y quercitina (flavonoides) (Medina y Cardemil, 1993; FAO, 1998). La fermentación de 100 kg de vainas proporcionan 27.2 litros de alcohol absoluto. Las semillas contienen alrededor de 32% de proteínas, 2.5% de aminoácidos libres (metionina y cisteína) y cenizas de calcio, fósforo, potasio y sodio. En estudios realizados en India muestran que la semilla puede ser utilizada como fuente alternativa de proteínas de consumo humano, eliminando los factores antinutricionales mediante tratamiento de calor o cocción (FAO, 1998).

También sus hojas se utilizan en la medicina tradicional para la inflamación de ojos, la disentería y de algunas enfermedades de la boca y de la garganta; la madera se utiliza para la fabricación de muebles, construcciones rurales y elaboración de carbón y la corteza y el corazón del tronco contienen de

6 a 7 % de taninos que se aprovecha para curtir pieles (Solís y Espericueta, 2005; López-Franco et al., 2006). El mezquite es un estabilizador de las dunas del desierto ya que posee un sistema de radicular que ayuda a conservar la humedad en el suelo y subsuelo.

Por otra parte *P. chilensis* es una especie representativa en su género, ya que puede ser utilizado para reforestar escuelas de educación primaria y jardines de niños situados en las comunidades de áreas con escasa humedad y alta salinidad del estado de Sonora; asimismo también ser utilizado como árbol de ornato. Debido a su incapacidad de producir espinas (inerte), provoca seguridad en estas escuelas. Sin embargo, para la reproducción de *P. chilensis*, este es limitado por una carencia del nitrógeno disponible en suelo. Esta condición afecta su potencial de crecimiento y de reproducción. Tradicionalmente los viveros bajo riego en condiciones de campo en el desierto de Sonora, para reproducir mezquite aplican fertilizantes químicos para compensar la deficiencia de nitrógeno. Sin embargo, el uso indiscriminado de este tipo de fertilizantes, puede aumentar la salinidad y dañar seriamente la estructura y composición de la microflora del suelo. Estudios relacionados con la interacción planta microorganismo en *Prosopis* spp., se limitan a estudios únicamente con micorrizas. Sin embargo con relación a bacterias promotoras de crecimiento de plantas autóctonas de ambientes áridos-salinos se reducen a unos pocos.

La hipótesis planteada en el siguiente estudio fue: existen en el mezquite (*Prosopis glandulosa*) bacterias promotoras de crecimiento y estas a su vez promuevan el crecimiento en mezquite chileno (*Prosopis chilensis*).

Por lo anterior el objetivo general del presente estudio consistió en, obtener poblaciones bacterianas con capacidad de promover el crecimiento de plantas de la rizósfera de plantas del desierto de Altar, Sonora como lo es el Mezquite (*Prosopis glandulosa*), y demostrar su participación en el crecimiento de plantas con fines de reforestación como es el Mezquite inerme *Prosopis chilensis*. Asimismo, obtener material vegetativo de *Prosopis chilensis* haciendo uso de las BPCP para su reforestación. Los objetivos particulares fueron: aislar, purificar e identificar bacterias promotoras de crecimiento de plantas (BPCP), asociadas a rizósfera del mezquite sonorense (*Prosopis glandulosa*). Cuantificar la actividad enzimática de la nitrogenasa responsable de la fijación de nitrógeno. Evaluar el efecto promotor del crecimiento de plantas de mezquite (*Prosopis chilensis*) por medio de estas bacterias en experimentos de inoculación en semilla y desarrollo de plantas, en forma líquida, *in vitro*, y en invernadero.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. El género *Prosopis* spp.: el mezquite

Los mezquites son nativos de las regiones subtropicales y tropicales, y abundan de forma especial desde el suroeste de Estados Unidos y México, hasta América Central y la parte de América del Sur, así como en Norte y Centro de África y el Oeste de Asia. En México la mayor cantidad de mezquite se localiza en los Estados del centro y norte del país, entre los que sobresalen Tamaulipas, Nuevo León, Coahuila, Sonora, Baja California, San Luis Potosí y Michoacán (FAO, 1998).

A nivel mundial, el género *Prosopis* tiene 44 especies, de las cuales 42 se encuentran en el Continente americano en dos grandes centros; el norteamericano (México-Texano) y el sudamericano (Argentina-Paraguayo-Chileno) (INE, 1994). Según Rzedowski (1988), el complejo norteamericano cuenta con 10 especies, todas ellas presentes en la República mexicana, las cuales tienen la siguiente localización:

Prosopis palmeri: endémica de Baja California.

P. reptans var. *cinerascens*: halófito subarborescente que crece en el norte de Tamaulipas y se extiende hacia el sur de Texas, en Estados Unidos de América.

P. pubescens: norte de Chihuahua y Baja California.

P. articulata: endemismo de la región del Mar de Cortés, crece en áreas pequeñas de Sonora y Baja California Sur.

P. tamaulipana: especie endémica de la parte seca de La Huasteca, crece en los límites entre los estados de Tamaulipas, San Luis Potosí y Veracruz, donde coexisten con *P. laevigata* y quizá no sea sino una variante de esta última.

P. velutina: se desarrolla en el estado de Sonora, hacia los bordes de su área de distribución, muestra influencia genética de *P. glandulosa*.

P. juliflora: esta especie crece en ambientes costeros del litoral del Pacífico, desde Sinaloa hasta Panamá. Esta es de las especies menos xerófilas de *Prosopis*, pues prospera en sitios con lluvias de hasta 1,500 mm anuales.

P. laevigata: se localiza en el centro y sur de México, en ambientes muy diversos que van desde los subhúmedos hasta áreas con precipitaciones de 300 mm anuales o menos; se encuentran en los estados de Guerrero, Querétaro, Estado de México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Veracruz, Nuevo León, Aguascalientes, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco y Zacatecas; donde su distribución hace contacto con *P. glandulosa* se observa una amplia franja de coexistencia con árboles de caracteres intermedios.

P. glandulosa: es el mezquite dominante del norte de México, presenta dos variedades bien diferenciadas:

P. glandulosa var. *glandulosa*: se localiza en los estados de Coahuila, Chihuahua, Sonora, Nuevo León y norte de Tamaulipas.

P. glandulosa var. *torreyana*: crece en Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Sinaloa, Coahuila, Nuevo León, Zacatecas y norte de San Luis Potosí.

2.1.1. Usos y propiedades

El mezquite tuvo una crucial importancia para los primeros pobladores de las regiones áridas y semiáridas, por los usos que cada pueblo le dio. Los pueblos cazadores-recolectores, casi todos ellos nómadas, utilizaron al mezquite principalmente como alimento, combustible, sombra, para la elaboración de juguetes y utensilios y como planta medicinal. En los años 1800-1900, se le encontraron diferentes usos, tales como: alimentación del ganado doméstico, elaboración de carbón, leña, flora para la explotación de abejas, extracción de gomas y material de vivienda. En la actualidad, el mezquite sigue presentando los mismos usos, por lo que es considerado como un recurso natural de importancia en las zonas áridas y semiáridas de nuestro país (INE, 1994; Solís y Espericueta, 2005).

La leña en México es el principal combustible utilizado en el medio rural. Se estima que el uso de madera para energía (leña y carbón vegetal) es de 38 millones de metros cúbicos al año. La leña aporta el 80% de la energía usada en los hogares rurales, 10% del total de la energía primaria usada en el país y menos del 3% del total de emisiones de carbono (INE, 1994).

Según el Inventario Nacional Forestal levantado en el año 2000, alrededor del 70% de la superficie total de la entidad de Sonora esta cubierta por tres formaciones vegetales naturales (matorral, selva y bosque) y el resto la ocupan cultivos, pastizal, vegetación hidrófila y otros tipos de coberturas. Sonora cuenta con alrededor de 13 millones de hectáreas de zonas forestales con condiciones de vegetación y suelo apropiados para la producción de madera y otros

productos no maderables. Alrededor de 1.7 millones de hectáreas de terrenos de aptitud forestal son utilizadas a otros usos o están en proceso de degradación por incendios, plagas, erosión que requieren de algún tipo de restauración y un poco más de un millón de hectáreas declaradas como áreas naturales protegidas. Existen 1,279,417 hectáreas desmontadas en el estado de Sonora. Aunque la mayoría de los desmontes se han realizado con fines pecuarios, en matorrales y pastizales, una gran proporción de los desmontes se han realizado en zonas boscosas, y en áreas sin uso aparente, 135,408 hectáreas, estas últimas probablemente para obtención de leña y extracción de especies para artesanías (Velázquez et al., 2002).

2.1.2. Descripción botánica del mezquite (*Prosopis* spp.)

Reino: Plantas (*plantae*).
 Filum: Espermatofitas (*Spermatophyta*).
 Clase: Dicotiledóneas (*Leguimosae*).
 Familia: Mimosáceas (*Mimosaceae*).
 Género: *Prosopis*.
 Especie: spp. (diversas).
 Nombre: *Prosopis* spp.

El mezquite es un árbol o arbusto espinoso, perenne, que llega a medir hasta 10 m de altura, de acuerdo con la profundidad del suelo.

Raíz. Su raíz principal puede alcanzar hasta 50 m de profundidad, para llegar al manto freático de agua subterránea; sus raíces laterales se extienden en un radio hasta de 15 m.

Tronco; ramas. Tronco leñoso, de corteza oscura o negra; ramas tlexuosas, formando una copa esférica o deprimida. Las ramas tiernas son espinosas y con frecuencia carecen de hojas.

Hojas. Son compuestas (con el limbo subdividido), bipinnadas, con 12 a 15 pares de folíolos oblongos o lineares de 5 a 10 mm de largo, pero caducas en invierno. Los renuevos nacen desde marzo hasta mayo y permanecen hasta diciembre.

Flores. Son muy pequeñas, de color amarillo verdoso, agrupadas en inflorescencias en racimos en forma de espiga: producen un aroma y néctar agradable que atrae a los polinizadores. Son hermafroditas, de simetría radiada (actinomorfas), con cinco sépalos, cinco pétalos y diez estambres; ovario súpero, unilocular, unicarpelar y de placentación parietal; el estigma es cóncavo. Florece durante un corto período que se inicia en febrero-marzo y termina en abril-mayo.

Fruto. Los frutos son vainas o legumbres alargadas; rectas o arqueadas, de 10 a 30 cm de longitud, de color paja a rojizo violáceo. El mesocarpio contiene una pulpa gruesa y esponjosa de sabor dulce; contiene de 12 a 20 semillas. La fructificación se extiende de mayo a agosto y se cosecha entre agosto y octubre.

Semilla. Es de forma oblonga o aplastada, dura; su color varía de café claro a oscuro. La diseminación de las semillas es zoófila y endozoica, es decir, su dispersión se hace por medio del tracto digestivo de animales (Burkarlt, 1952; INE, 1994).

3. *Prosopis chilensis*: mezquite chileno

Una especie importante del género *Prosopis* es el *chilensis* denominado como mezquite chileno. La especie *chilensis* es originaria de Chile, aunque su distribución se ha extendido hasta algunas regiones áridas y semiáridas del Norte, Centro y Sudamérica; también se ha propagado por África y Asia (Cordo et al., 1987). Es un árbol muy exigente en cuanto a radiación lumínica, especialmente en intensidad, resiste altas temperaturas, pero es algo sensible a las heladas. Se recomienda no plantarlo bajo el dosel de otros árboles debido a su intolerancia a la sombra. Adaptado a condiciones de estrés hídrico, presenta un fuerte desarrollo radicular en profundidad, que ya revela en la etapa juvenil. *Prosopis chilensis* al igual que *Prosopis alba* y *Prosopis flexuosa*, son especies subtropicales que pueden tolerar temperaturas de -5°C, pero son severamente dañadas con temperaturas de -12°C. *P. chilensis* tiene una gran plasticidad en su hábito de crecimiento, encontrándose en sus poblaciones naturales, individuos arbustivos, subarbóreos y arbóreos, y con gran variabilidad en la presencia y magnitud de las espinas y en los frutos. Especie freatófita, se han registrado raíces entre 10-20 m de profundidad. Esta característica le permite ocupar áreas con precipitaciones muy inferiores a los requerimientos normales de la especie (FAO, 1998).

3.1. La germinación

La germinación es el conjunto de fenómenos por los cuales el embrión, que se encuentra en estado de vida latente dentro de la semilla, reanuda su crecimiento y se desarrolla para formar una plántula. Para que se produzca

deben darse condiciones favorables de oxigenación, temperatura, luz, humedad y salinidad (Besnier, 1988).

Proceso de germinación. Camacho (1994) indica que la absorción de agua por la semilla, desencadena una secuencia de cambios metabólicos, que incluyen la respiración, la síntesis proteica y la movilización de reservas; a su vez la división y el alargamiento celular en el embrión provocan la ruptura de las cubiertas seminales, que generalmente se produce por la emergencia de la radícula. Squires (1994) señala que no obstante lo anterior, las semillas de muchas especies son incapaces de germinar, incluso cuando se encuentran en condiciones favorables. Esto es debido a que las semillas se encuentran en estado de latencia. Por ello, mientras no se den las condiciones adecuadas para la germinación, la semilla se mantendrá latente durante un tiempo variable, dependiendo de la especie, hasta que llegado un momento, pierda su capacidad de germinar. Cuando una semilla germina, la primera estructura que emerge, de la mayoría de las especies, después de la rehidratación de los diferentes tejidos es la radícula.

En el proceso de germinación se pueden distinguir tres fases acorde a Ungar (1987a) y Salisbury y Ross (1994): 1) Fase de hidratación: la absorción de agua es el primer paso de la germinación, sin el cual el proceso no puede darse. Durante esta fase se produce una intensa absorción de agua por parte de los distintos tejidos que forman la semilla. Dicho incremento va acompañado de un aumento proporcional en la actividad respiratoria; 2) Fase de germinación: representa el verdadero proceso de la germinación. En ella se producen las

transformaciones metabólicas, necesarias para el correcto desarrollo de la plántula. En esta fase la absorción de agua se reduce considerablemente, llegando incluso a detenerse y, 3) Fase de crecimiento: es la última fase de la germinación y se asocia con la emergencia de la radícula (cambio morfológico visible). Esta fase se caracteriza porque la absorción de agua vuelve a aumentar, así como la actividad respiratoria. La duración de cada una de estas fases depende de ciertas propiedades de las semillas, como su contenido en compuestos hidratables y la permeabilidad de las cubiertas al agua y al oxígeno. Estas fases también están afectadas por las condiciones del medio, como el nivel de humedad, las características y composición del sustrato, la temperatura, etc. Otro aspecto interesante es la relación de estas fases con el metabolismo de la semilla. La primera fase se produce tanto en semillas vivas y muertas y, por tanto, es independiente de la actividad metabólica de la semilla. Sin embargo, en las semillas viables, su metabolismo se activa por la hidratación. La segunda fase constituye un período de metabolismo activo previo a la germinación en las semillas viables o de inicio en las semillas muertas. La tercera fase se produce sólo en las semillas que germinan y obviamente se asocia a una fuerte actividad metabólica que comprende el inicio del crecimiento de la plántula y la movilización de las reservas. Por tanto los factores externos que activan el metabolismo, como la salinidad, tienen un efecto estimulante en la última fase. En las dos primeras fases de la germinación, los procesos son reversibles, pero a partir de la fase de crecimiento se entra en una situación fisiológica irreversible. La semilla que haya superado la fase de germinación tendrá que

pasar a la fase de crecimiento y originar una plántula, o por el contrario morir (Salisbury y Ross, 1994).

Comportamiento de las distintas partes del embrión. La radícula y el hipocótilo presentan en el momento de la germinación, cambios estructurales sumamente importantes. En el caso de la radícula, éste órgano es observado una vez que emerge por el micrópilo, dando origen a la raíz primaria. Su duración es efímera en las monocotiledóneas que generalmente desarrollan raíces adventicias, mientras en gimnospermas y dicotiledóneas origina la raíz principal que dura toda la vida de la planta. Respecto al hipocótilo, su crecimiento es importante en la germinación epigea, eleva los cotiledones por encima del suelo. El epispermo se rasga y los cotiledones, expuestos a la luz, se vuelven los primeros órganos fotosintetizadores (Philipupiya y Ungar, 1984).

3.2. Problemas de la germinación en halófitas

Bajo condiciones de salinidad uno de los principales problemas es obtener un porcentaje de germinación adecuado. Estas condiciones deben considerarse, ya que si el porcentaje de germinación es bajo, el cultivo puede fracasar. En estudios de laboratorio, se ha considerado el brotamiento de la radícula y coleóptilo de la semilla como un criterio para evaluar la germinación. Con este criterio se ha considerado que la germinación ha ocurrido después del día de la siembra. Estas mismas consideraciones se han dado en pruebas de germinación para medir la tolerancia a las sales. Esto puede conducir a resultados erróneos ya que desde el punto de vista agronómico la germinación se considera realizada cuando las plantas afloran a la superficie del suelo, lo

cual a veces no ocurre en suelos con sales en los cuales las semillas producen raíces y parte del coleóptilo nunca aparece en la superficie del suelo. La tolerancia de los cultivos a las sales durante la germinación, depende de la especie, de la concentración y del tipo de sales.

Existen tres etapas en el proceso de germinación en las cuales las sales pueden tener influencia. Estas etapas son: etapa heterotrófica, etapa de transición y etapa autotrófica. a) etapa heterotrófica: ocurre desde la imbibición de la semilla hasta la iniciación de la fotosíntesis; durante esta etapa la plántula se alimenta de las reservas del endospermo de la semilla; b) etapa de transición: se inicia el desarrollo de la plántula, la cual se alimenta de compuestos orgánicos complejos obtenidos del remanente del endospermo y productos fotosintetizados y, c) etapa autotrófica: ocurre después de que la planta ha consumido completamente el endospermo y su alimentación depende completamente de los productos fotosintetizados por ella misma. Las etapas en las que las semillas son más sensibles a la salinidad son la heterotrófica y la autotrófica, ya que en la primera puede inhibirse la imbibición de agua por las sales. Si esto ocurre no hay germinación. En la segunda, es cuando la planta consumió todas las reservas del endospermo y tiene que obtener nutrientes del suelo conjuntamente con sales, las que pueden ocasionar su muerte. Un caso típico es el arroz, el cual germina aceptablemente en suelos con altos contenidos de sales (hasta 8 mmhos/cm); sin embargo, en las etapas subsecuentes hasta cuando aparece la cuarta hoja, es muy sensible. El caso contrario lo presenta la

remolacha, la cual es muy sensible en la etapa de germinación, pero después de germinar tolera contenido de sales hasta de 18 mmhos/cm (Aceves, 1979).

4. Microorganismos benéficos para el crecimiento y desarrollo de las plantas

Se distinguen tres grandes grupos: a) microorganismos fijadores de nitrógeno, b) hongos micorrízicos, c) bacterias promotoras de crecimiento de plantas.

4.1. Microorganismos fijadores de nitrógeno

Entre los microorganismos involucrados en la Fijación Biológica de Nitrógeno se encuentran: bacterias, algas verde-azules (cianobacterias), los cuales pueden fijar el nitrógeno viviendo libremente o formando asociaciones (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2001). Debido a que la rizósfera constituye toda la zona de influencia de la raíz, es decir, la raíz y su ambiente suelo con todos los microorganismos que en ella se desarrollan. Los microorganismos que se desarrollan en la rizósfera dependen de los compuestos químicos que allí se contienen por incorporación de los constituyentes orgánicos de las plantas (celulosa 15-60%, hemicelulosa 10-30%, 5-30%, azúcares-aminoácidos y ácidos alifáticos 5-30%, grasas, aceites, resinas, pigmentos, proteínas, minerales 1-13%).

La cantidad y tipos de poblaciones microbianas están relacionados con el exudado radicular y varía de acuerdo a los factores ambientales que influyen en la exudación. La fluctuación poblacional depende del efecto de la rizósfera, lo

cual constituye al incrementar la distancia a la raíz. En suelo fértil hay alrededor de 10^9 microorganismos por gramo.

Los principales microorganismos que se sustentan en la rizósfera son:

Microflora: bacterias, actinomicetos, hongos y algas.

Micro y mesofauna: protozoarios, nemátodos, insectos.

Bacterias: Son los microorganismos más abundantes del suelo entre 10^6 - $9/g$ abarcan 4-10% del área radicular.

Actinomicetos: son los segundos en abundancia y la mayoría corresponde a tres géneros: *Streptomyces* y *Micromospora* de *Streptomycetaceae* y *Nocardia* de *Actinomycetaceae*.

4.2. Asociaciones ecológicas que se establecen entre los microorganismos del suelo:

Neutralismo. Dos microorganismos independientes. Es probable que ocurra cuando las densidades de las poblaciones son bajas, el aporte de nutrientes abundantes son satisfechos los requerimientos para el desarrollo de las poblaciones, de modo que no interactúen para los nutrientes, el espacio, etc., pero cuando el ambiente comienza a modificarse por la actividad biológica o cuando el aporte de nutrientes comienza a disminuir, las especies comienzan a interactuar.

Competencia. Lucha por un factor limitante. En ambientes naturales, suelo, agua, los sustratos energéticos y los nutrientes son por lo general limitantes como para mantener altas poblaciones microbianas. Estas interactúan compitiendo por los sustratos: se habla de competencia nutricional. Si

excepcionalmente, el ambiente es rico de nutrientes, la competencia puede ejercerse por el espacio, la luz, etc. Este tipo de interacción ejerce un profundo impacto en la sucesión de microorganismos, en la selección natural y en la composición de las comunidades microbianas. Podemos hablar de competencia interespecífica o intraespecífica, según se realice entre organismos de la misma o diferente especie.

Protocooperación. Asociación en beneficio mutuo, no obligatoria. Estas relaciones involucran beneficio mutuo para dos o más especies y presentan carácter bastante laxo, es decir que la existencia de cada integrante de la asociación en un ambiente no requiere una especie particular, sino que muchos integrantes de la población pueden brindarle los requisitos para su crecimiento. Los organismos que interactúan bajo ciertas condiciones ambientales, pueden proliferar independientemente, en otras condiciones. Se les denomina también mutualismo no obligatorio o simbiosis nutricional.

Comensalismo. Constituye una interacción muy común en la naturaleza, en donde los procesos de degradación de moléculas complejas son realizados por lo general por poblaciones mixtas (cadenas alimenticias), cada una de las cuales ofrece a las otras un sustrato más simple. El organismo que recibe el beneficio se denomina comensal y la relación es con frecuencia, pero no necesariamente, casual, ya que gran número de especies puede colaborar, existiendo poca especialización entre los asociados. Un organismo puede proveer hábitat favorable para su desarrollo a otro, el comensal, quien no

perjudica ni beneficia al organismo que lo alberga (endocomensalismo). Estas relaciones derivan ocasionalmente hacia el parasitismo.

Simbiosis. Involucran relaciones bastante duraderas en las cuales dos o más especies viven en inmediata proximidad y obtienen beneficios mutuos de su interacción. En un hábitat dado, la simbiosis resulta casi siempre de carácter obligatorio, para que los simbiositos realicen sus funciones vitales. Algunos biólogos emplean el término mutualismo para referirse a estas asociaciones y reconocen la simbiosis mutualísticas, en donde ambos integrantes se benefician, y las simbiosis parásitas, en las cuales un integrante se beneficia pero el otro no se afecta, o a veces sufre daño más o menos severo. Ejemplo.

Líquenes. Algas (Fijan CO_2), hongos (protección y humedad).

Bacterias. Protozoarios (algunos ciliados).

Nódulos. *Rhizobium* (bacteria que fija N_2), leguminosa (metaboliza CO_2).

Micorrizas. Hongos (aumenta la absorción), Raíz (Síntesis).

Amensalismo. Supresión de una especie, por toxinas o sustancias inhibidoras. Ejemplo: producción de antibióticos como (estreptomicina, cloranfenicol, clorotetraciclina, cicloheximida).

Parasitismo. Es un organismo que se nutre a partir de células, tejidos o fluídos de otro organismo. Usualmente mayor, llamado hospedante, el que generalmente es injuriado en el proceso. El parásito es dependiente en alto grado del hospedante, a expensas del cual se nutre y con el que se mantiene en contacto físico y metabólico íntimo durante considerable fracción de su vida. Muy pocos organismos están libres de ataque de parásitos microbianos. Numerosos

parásitos mantienen contacto prolongado y se alimentan por largo período de su hospedante y pueden atacar un rango estrecho de organismos.

Predación. En este antagonismo el período de contacto es generalmente corto y la presa es muerta y digerida rápidamente. El predator vive, por lo general, libre, es mayor en tamaño que su presa y presenta menor especificidad en sus hábitos alimenticios. Constituye una de las más dramáticas interacciones entre microorganismos en la naturaleza. Las bacterias son los organismos más expuestas al ataque de predadores, sobre todo protozoos, algas y hongos (López, 1992; Frioni, 1999; Atlas y Bartha, 2002).

4.3. Fijación de nitrógeno

Este es uno de los procesos bioquímicos que ocurren en el suelo donde los microorganismos juegan uno de los papeles más cruciales: la transformación del nitrógeno atmosférico (N_2). Ya que es la reducción del nitrógeno atmosférico a amonio y es realizada por un selecto grupo de bacterias, entre ellas podemos encontrar a las del género *Azospirillum halopraeferens* y *Klebsiella pneumoniae*. A pesar de que el nitrógeno es un elemento esencial para los seres vivos, la mayoría de estos, incluyendo a las plantas y a los animales, son incapaces de asimilarlo directamente de la atmósfera, en la que se encuentra en un 80% de los gases que la componen. La fijación biológica de nitrógeno constituye el principal aporte natural de nitrógeno hacia la biosfera. La adquisición y fijación del nitrógeno es fundamental para el crecimiento y desarrollo vegetal, superada en importancia sólo por la fotosíntesis (Rodríguez, 1982).

Existe dos grupos de microorganismos que están implicados en este proceso: 1) microorganismos no simbióticos, que viven libres e independientemente en el suelo y 2) microorganismos simbióticos como los que viven en las raíces de las plantas leguminosas.

La fijación simbiótica del nitrógeno está realizada por la asociación de bacterias del género *Rhizobium* con leguminosas. Antes que estas bacterias puedan fijar nitrógeno, deben establecerse en las células de los tejidos de la raíz de la planta hospedadora (Pelczar y Chan, 1981).

4.4. Importancia de los microorganismos fijadores de nitrógeno

Estudios previos de interacción planta-microorganismo en plantas del desierto como el cardón (*Pachycerus pringlei*), indican que existe una respuesta de un 35-45% en cuanto a biomasa y longitud radicular de la planta en comparación con aquellas plantas que no son inoculadas con la bacteria *Azospirillum brasilense* (Carrillo, 2002).

Existen microorganismos capaces de fijar nitrógeno atmosférico en la mayoría de los hábitats: en el suelo, en el mar, en las masas de agua dulce e incluso en las fuentes termales. También hay que decir que la incorporación de este elemento debido a organismos libres probablemente es muy importante en ecosistemas naturales, donde su requerimiento no es tan elevado como en los campos cultivados. La relación parece resultar obvia, una mayor cantidad de microorganismos fijadores en el medio se corresponderá con una mayor fijación de nitrógeno. La distribución de las bacterias fijadoras en los distintos hábitats es muy variable (Pérez y Torralba, 1997).

Kloepper et al. (1992), reportan diversos microorganismos con efecto benéfico en las plantas que pueden tener un potencial considerable como agentes biocontroladores y biofertilizantes.

5. Bacterias promotoras de crecimiento de plantas (BPCP)

En años recientes, se ha retomado el interés de estudiar bacterias promotoras de crecimiento en la producción de cultivos, ya que al aplicarse en semillas, tubérculos o raíz, son capaces de colonizar las raíces de las plantas y estimular el crecimiento y rendimiento de cultivos (Kloepper et al., 1992). Se conoce un gran número de este tipo de microorganismos, las cuales son bacterias de vida libre o asociativas que fijan N_2 , pero sólo algunas destacan por su potencial como biofertilizantes o promotoras de crecimiento ya que al ser inoculados en las plantas pueden tener un potencial considerable como agentes biocontroladores y biofertilizantes (Kapulnik et al., 1981; Khammas et al., 1989; Bashan y Holguin, 1997). Entre los géneros más conocidos son: *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azospirillum* y *Klebsiella*.

Jiménez et al. (2001), indican cuatro características que diferencian a las rizobacterias de las promotoras de crecimientos entre las que destacan que no requieren de la invasión interna de tejidos en plantas; que tienen una elevada densidad poblacional en la rizósfera después de su inoculación; que presentan capacidad de colonización efectiva en la superficie de la raíz y que no producen daño en el hombre ni a otros microorganismos.

En cuanto al efecto positivo sobre el crecimiento por las plantas, las BPCP pueden actuar de manera en que los metabolitos producidos de las BPCP

pueden funcionar como determinantes antagónicos, y cuando los metabolitos son producidos por algunas cepas de las bacterias, éstos sean utilizados como reguladores de crecimiento o precursores de estos por parte de la planta (Fallik et al., 1988).

Para ser consideradas BPCP, estas bacterias deben poseer ciertas propiedades que definen a este grupo. Competir con éxito con la microflora del suelo. Por lo tanto deben sobrevivir adecuadamente sobre las semillas inoculadas, multiplicarse en la región que rodea a las semillas respondiendo a los exudados de estas y pegarse a las raíces. Deben colonizar efectivamente la superficie de la raíz e influenciar el crecimiento de la planta. A pesar del importante avance en la formulación y desarrollo de los inoculantes, la respuesta de los cultivos varía considerablemente. Éstas dependen de una multitud de factores entre los cuales destacan: el microorganismo, especie vegetal, tipo de suelo densidad del inoculante, competitividad con otros microorganismos autóctonos del suelo y las condiciones medio ambientales. En general, al poco tiempo de introducir la bacteria en el suelo, la población disminuye rápidamente (Bashan y Levany, 1987). Para que el microorganismo introducido sea efectivo, debe establecerse en un elevado número en la rizósfera de la planta inoculada y deberá mantener los niveles de colonización durante la fase en la que los microorganismos ejercen la acción para la cual fueron aplicados. Para que el microorganismo llegue en el mejor estado al momento su aplicación es esencial un sustrato que mantenga las características originales del inóculo el mayor tiempo posible.

Se ha avanzado mucho en la formulación de inoculantes pero no se puede hablar de un sustrato universal. Una característica común que todos deben cumplir es ser capaces de liberar el número adecuado de células viables en buenas condiciones fisiológicas en el momento de la inoculación (Fages, 1992; Smith, 1992).

5.1. *Azospirillum* spp.: un género bacteriano promotor del crecimiento vegetal (Importancia, distribución y aislamiento)

Azospirillum es la bacteria promotora de crecimiento más estudiada, las primeras inoculaciones con esta bacteria se dio en maíz en Europa y, en maíz y trigo en Sudáfrica (Dobbelaere et al., 2001).

Las bacterias del género *Azospirillum* poseen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, lo cual proporciona a las plantas nitrógeno asimilable y promueve la liberación de hormonas, como ácido indolacético y auxinas, lo que da como resultado una estimulación para la ramificación de las raíces y desarrollo de pelos radiculares (33-40% adicionales). Además, se ha sugerido que están involucradas en una mejor absorción de minerales y agua por parte de la planta, lo que contribuye al crecimiento y aumento del rendimiento de las plantas (Kapulnik et al., 1981; Khammas et al., 1989; Bashan y Holguin, 1997).

Actualmente son reconocidas seis especies en el género *Azospirillum*. Las dos primeras en ser descritas fueron *A. lipoferum* y *A. brasilense* (Tarrand, 1978), siendo éstas las más ampliamente estudiadas. Posteriormente fueron descritas las especies *A. amazonense* (Magalhães et al., 1983), *A. halopraeferens* (Reinhold, et al., 1987), *A. irakense* (Khammas et al., 1989), y *A.*

largomobile (Ben Dekhil et al., 1997), siendo el nombre de esta especie corregido a *A. largimobile* (Sly y Stackebrandt, 1999). Pocos años antes, ésta especie fue considerada como un sinónimo de la especie *A. lipoferum* (Falk et al., 1986). Recientemente, en honor de quien impulsara los estudios con este género bacteriano y descubriera otros diazótrofos, se ha propuesto la especie candidata *A. doebereineri* (Hartmann et al., 2000).

Azospirillum spp., fue aislada por primera vez por Beijerinck en 1925 en Dinamarca, a partir de suelos arenosos pobres en N; inicialmente fue denominada con el nombre de *Spirillum lipoferum*. Se ha detectado una amplia distribución en la rizósfera de varios pastos tropicales, silvestres y cultivados, cereales y leguminosas, en suelos tropicales, subtropicales y templados de todo el mundo. Estos microorganismos pueden encontrarse en la filósfera o en la rizósfera, y se caracterizan por adherirse a la superficie de raíz y no formar nódulos. También se les encuentra en las regiones frías y desérticas (Beinjerinck, 1925; De Coninck et al., 1988; Döbereiner et al., 1976; Haahtela et al., 1981; Tyler et al., 1979). En las regiones templadas del sur de Brasil, los Estados Unidos y Kenia la presencia de *Azospirillum* es menor al 10% en las muestras analizadas (Döbereiner et al., 1976).

Bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre como el género de *Azospirillum* han sido encontrados presentes en la rizósfera de muchas plantas también han sido aislados de rizósfera de cactus la bacteria *Azospirillum lipoferum* por ejemplo en la rizósfera de las especie *Opuntia* que se desarrollan en la India (Rao and Venkateswarlu, 1982) y en México. Otras especies como

Azospirillum brasilense podrían estar presentes en la rizósfera de *Opuntia ficus-indica*, *Stenocereus pruinosus* y *Stenocereus stellatus* (Mascarua-Esparza et al., 1988).

El género *Azospirillum*, aun cuando haya sido en la mayoría de los casos identificado en las regiones tropicales, también se encuentra en las regiones templadas del sur de Brasil, Estado Unidos y Kenia, la presencia de *azospirillum* es menor a 10% en las muestras (Drozdowiez y Ferreira, 1987). El pH del suelo desempeña un papel del género *Azospirillum*. Las especies de *A. brasilense* y *A. lipoferum* se encuentra en mayor abundancia en suelos con valores de pH cercanos a la neutralidad, aun cuando a pH bajo de 5 se les encuentra en forma esporádica y no lográndose su aislamiento de suelos con pH menor a 4.5. Un estudio en el que se evaluaron 23 tipos de suelos con características diferentes mostró que algunos factores abióticos, como porcentaje de arcilla, contenido de materia orgánica, capacidad de retención de agua y contenido de nitrógeno, afectan de forma positiva la sobrevivencia de *A. brasilense*; en tanto que el tamaño de las partículas de arena y, en especial, la alta concentración de carbono de calcio afectan de manera negativa a la sobrevivencia de esta especie en ausencia de plantas. No obstante, la sobrevivencia de *A. brasilense* en la rizósfera es independiente de la aridez del suelo (Puente y Bashan, 1993).

Las bacterias del género *Azospirillum* poseen la capacidad de fijar N₂ atmosférico, lo cual proporciona a las plantas nitrógeno asimilable y de promover la liberación de hormonas, como ácido indolacético (AIA) y auxinas, lo que da como resultado una estimulación para la ramificación de las raíces y desarrollo

de pelos radiculares (33-40%) (Bashan et al., 2002), debido a que están involucradas en una mejor absorción de minerales y agua por parte de la planta lo que contribuye al crecimiento y aumento del rendimiento de las plantas (Hartmann et al., 2000). El aislamiento de las bacterias del género *Azospirillum* resulta en lo general muy simple, ya sea a partir de suelo rizosférico o de la superficie de las raíces de numerosas plantas hospederas. También se le aísla del interior de las raíces o tallos de algunas plantas. El medio de cultivo usado por excelencia para el enriquecimiento de las especies de *Azospirillum* ha sido el medio semigelificado "libre" de nitrógeno y con malato como fuente de carbono (Döbereiner et al., 1976).

Las investigaciones realizadas en los últimos 30 años en diversos países, a través de experimentos hechos en campos agrícolas, con diferentes plantas, han incluido que las especies de este género son capaces de promover la producción agrícola en diferentes suelos y condiciones de clima. La mayoría de los estudios sobre la asociación *Azospirillum*-planta se han llevado a cabo en cereales, pastos, hortalizas y árboles (Bashan et al., 2004).

Los efectos más sobresalientes de la inoculación vegetal con *Azospirillum* son los diversos cambios morfológicos que sufre el sistema radicular. Estos cambios se encuentran directamente relacionados con la concentración del inóculo; cuando este es superior a los niveles óptimos tiene efectos inhibidores, mientras que dosis bajas no causan efecto. Se ha observado que el nivel de inoculación óptimo en semillas y plántulas para muchos cereales, y en vegetales y plantas de cultivo comerciales, es de alrededor de 10^5 - 10^6 unidades

formadoras de colonias (ufc/mL) (Bashan, 1986), mientras que para el maíz es de 10^7 ufc/mL (Fallik et al., 1988). Una concentración del inóculo de 10^8 - 10^{10} ufc/mL generalmente inhibe el desarrollo radicular, excepto para el tomate cuyo nivel de inoculación en condiciones *in vitro* es $>10^8$ ufc/mL. Estos datos no han revelado cuantas células bacterianas por semilla o plántula se requieren para obtener una respuesta vegetal positiva.

6. Rizósfera y filosfera

La rizósfera es la región del suelo inmediata a la raíz; es una zona donde la actividad microbiana suele ser de mayor intensidad. El rizoplaneo está constituido por la superficie de la raíz. El recuento de bacterias casi siempre es superior en la rizósfera/rizoplaneo que en las regiones del suelo donde no hay raíces; a veces, puede ser muchas veces superior. Esto se debe al hecho de que las raíces excretan cantidades considerables de azúcares, aminoácidos, hormonas y vitaminas estimulando un crecimiento tan intenso de bacterias y hongos que estos organismos a menudo forman microcolonias en la superficie de las raíces. Que favorece la presencia de bacterias nitrificantes, amonificantes y desnitrificantes; la presencia de desechos como son cápsulas, filamentos de raíces, células corticales y epidérmicas permiten el desarrollo de bacterias degradadoras de almidón, celulosa, hemicelulosas, sustancias pécticas, etc. En general, la abundancia de nutrientes favorece la proliferación de microorganismos activos encargadas del reciclaje de la materia orgánica. La filosfera es la superficie de la hoja de la planta y cuando la humedad es elevada, como ocurre en los bosques húmedos de las zonas templadas y tropicales, la

microbiota de las hojas puede ser muy abundante, comprendiendo tanto hongos como bacterias. Muchas bacterias que viven sobre las hojas fijan nitrógeno, y es probable que este mecanismo ayude a estos organismos a desarrollarse con los nutrientes que les proporcionan las hojas que son predominantes en carbohidratos (López, 1992; Madigan et al., 2006).

7. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevo a cabo en el Laboratorio Agrícola “Dr. Félix Ayala Chairez” de la División de Ciencias Administrativas, Contables y Agropecuarias de la Universidad de Sonora, Campus Santa Ana.

7.1. Muestreo de suelo y rizósfera de mezquite (*Prosopis glandulosa*)

Se colectaron muestras de 5 plantas de mezquite sonorense (*Prosopis glandulosa*) en tres sitios de los siguientes cráteres de volcán: El Elegante (31°40' N 113°30' W), Cerro Colorado (31° 30' N 113° 35' W) y El MacDougal (32°30'N 114°30'W), ubicados en la Reserva de la Biosfera el Pinacate y Gran Desierto de Altar, que se ubica en el extremo noroeste del estado de Sonora, México, entre los 113° 00 --114° 30 W y los 31° 30 --32° 30 N; de los árboles identificados, se les extrajo una porción del sistema radical (50 g). Las muestras fueron analizadas en el laboratorio agrícola del Campus Santa Ana de la Universidad de Sonora Unidad Regional Norte, en bolsas de polietileno dentro de una hielera manteniéndose a 4 °C en refrigeración hasta su procesamiento. Y se transportaron al laboratorio agrícola. Por su parte, las muestras de suelo fueron conservadas en refrigeración a 4 °C. Las muestras se colectaron el 28 de febrero de 2007. La temperatura del suelo en los sitios de muestreo fue medida usando un termómetro digital para pruebas de campo (Cole Plamer, type E, model 8110-11, Chicago, IL, USA).

7.2. Aislamiento de microorganismos asociados a la rizósfera de *Prosopis glandulosa*

a) Sistema radicular

Las raíces obtenidas de los árboles de mezquite, se cortaron en segmentos de 0.5 - 1 cm de longitud. Cinco gramos de raíces frescas de *Prosopis glandulosa* se colocaron en 50 mL de agua destilada junto con 20 perlas de vidrio en un matraz Erlenmeyer (un matraz de 250 mL*especie), y fueron agitadas constantemente a 200 rpm durante 15 min a 30 ± 1 °C (Incubadora con agitación rotatoria serie 25, New Brinswick, Edison, N.J.). Posteriormente, se prepararon medios de cultivos Rennie y OAB preparadas en placas conteniendo 0, 0.25 (14.60 g/L), 0.50 (29.20 g/L) y 0.75 (43.60 g/L) M de NaCl; las placas se incubaron a 30 ± 1 °C durante 48 hrs. Esta prueba se efectuó por triplicado. Los morfotipos coloniales se seleccionaron por sus características de: forma, color, borde, apariencia, consistencia y por su morfología celular; tinción Gram, movimiento y pruebas bioquímicas. Todas ellas, fueron purificadas en los mismos medios de manera convencional, y utilizando glicerol al 10% (v/v) como crioprotector (Malik, 1988). Dado que el medio de crecimiento no contuvo nitrógeno, todos los morfotipos obtenidos presuntamente fueron fijadores de nitrógeno. Los morfotipos puros fueron inoculados en viales conteniendo medio semisólido Rennie libre de nitrógeno e incubados de la misma forma inicial.

b) Suelo adherido

Para suelo adherido, se tomaron 4 g de suelo adherido a raíces y se diluyeron en agua destilada estéril en una proporción de 1:100; posteriormente, la solución resultante fue diluida en serie en una proporción 1:10 y de la quinta dilución se tomó 0.1 mL para sembrar en medios sólidos de OAB y Rennie conteniendo 0, 0.25 (14.60 g/L), 0.50 (29.20 g/L) y 0.75 (43.60 g/L) M de NaCl. Esta prueba se efectuó por triplicado. Las placas fueron incubadas durante 48 horas a 30 ± 1 °C.

Posteriormente, los aislados bacterianos fueron purificados utilizando el medio de cultivo Rennie, por la técnica de estriado.

7.3. Muestreo para análisis físico-químico de suelo fuera y dentro del dosel de mezquite

En cada uno de los sitios donde se recolectó raíz y suelo: fuera del área de la planta se realizó un muestreo de suelo, para ser comparados con el suelo que se encuentra en la rizósfera de mezquite y ver el contenido de micro y macro nutrientes en el suelo de la planta de mezquite. Se recolectaron un total de 10 muestras de suelo para dichos análisis, se llevaron a cabo muestreos de suelo a 0-30 cm de profundidad, con la ayuda de una pala y pico; las muestras fueron depositadas en bolsas de polietileno de aproximadamente un kilogramo por muestra y fueron transportadas al laboratorio agrícola de la Universidad de Sonora - Campus Santa Ana. A dichas muestras se les realizó los siguientes análisis: Nitratos (método Kjeldahl), fósforo por (método Bray-p1), potasio (método flamométrico), para cationes calcio, magnesio sodio y potasio (titulación

con EDTA (Aguilar et al., 1987). Conductividad eléctrica (medidor de conductividad), pH (método electrométrico), C.I.C. (saturación con amonio), % de Saturación (Universidad Autónoma de Chiapas, 2001).

7.4. Determinación de la capacidad de fijación de nitrógeno por las bacterias aisladas

Para identificar cepas fijadoras de N_2 se realizaron pruebas de reducción de acetileno. Esta prueba se fundamenta en la capacidad de la enzima nitrogenasa de reducir el acetileno a etileno el cual se cuantificó por cromatografía de gases. La actividad de la enzima mencionada demuestra la actividad de fijación de nitrógeno atmosférico por parte de las bacterias. Para llevar a cabo esta determinación se obtuvieron raíces de mezquite regional y las raíces se enjuagaron completamente con agua de la llave y Tween 20 al 2% (Sigma) inmediatamente fueron tratadas con el detergente por 10 minutos para remover cualquier tipo de polvo, después eliminar el detergente por enjuagues abundantes con agua destilada estéril, se cortaron las raíces con un bisturí estéril en piezas pequeñas (0.5 cm). Cinco piezas fueron colocadas en viales de cultivo tapados con torunda de algodón y gasa conteniendo 20 mL de medio semisólido Rennie (3.5 gr/L agar bacteriológico) libre de nitrógeno (Rennie, 1981), y se incubaron durante 6 días a 30 ± 1 °C sin movimiento. La película bacteriana que se formó en el medio de crecimiento fue separada y se realizaron diluciones seriadas en solución amortiguadora de fosfatos de Sorensen (PBS) pH=7. Placas petri conteniendo medio Rennie (2% agar) fueron inoculadas e incubadas por 48 hrs a 30 ± 1 °C. Posteriormente, de cada botella se extrajo 1

mL de aire con una jeringa y se inyectó la misma cantidad de acetileno, para ser incubadas durante 48 h a la misma temperatura. La prueba se realizó por quintuplicado comparándose conjuntamente con una cepa de *Azospirillum halopraeferens* Au4^T DSM 3675^T (Reinhold et al., 1987). En el cromatógrafo se inyectaron 50 µL de acetileno y 50 µL de etileno y el tiempo de residencia de cada valor máximo (pico) se utilizaron como estándar. El análisis de etileno se realizó mediante cromatografía de gases utilizando el cromatógrafo Varian 6000 (Varian Instrument Group, Georgia, Atlanta, U.S.A), equipado con detector de ionización de flama de hidrógeno (FID). Las condiciones operativas constaron de una columna de acero inoxidable empacada con Porapak N, 80/100, 50x0.2 cm; la temperatura de la columna fue de 60 °C, la temperatura del detector 200 °C, la temperatura del inyector fue de 50 °C, la tasa de flujo del hidrógeno y nitrógeno fue de 25 mL·min⁻¹ y la tasa de flujo de aire fue de 300 mL·min⁻¹ (Hardy et al., 1968; Holguin et al., (1992). Todos los morfotipos cultivables y que resultaron con alta fijación de nitrógeno (alta actividad de reducción de acetileno) fueron conservados en glicerol al 15% en viales criogénicos a temperatura de -40 °C. Varias de las cepas cultivables y que resultaron con alta fijación de nitrógeno (alta actividad de reducción de acetileno).

7.5. Caracterización por 16S rRNA de los potenciales aislados bacterianos

De los aislados bacterianos que mostraron altos niveles de fijación de nitrógeno y aquellos de mayor frecuencia en base a color, se seleccionaron cuatro por su capacidad fijadora de nitrógeno, para desarrollar las subsecuentes

evaluaciones, los cuales se enviaron para su identificación a Accugenix (Newark, De,USA) a nivel molecular por secuenciación del 16S rRNA.

7.6. Cinética bacteriana de aislados bacterianos potenciales bajo condiciones de salinidad y temperatura

Los cuatro aislados potenciales, fueron crecidos en vasos Erlen Meyer con medio líquido libre de fuente de nitrógeno “Rennie”, bajo diferentes concentraciones de salinidad (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl) y expuestos los medios a dos diferentes temperaturas: 30 y 50 °C, durante 20 hrs. Posteriormente, se procedió a conocer la cinética bacteriana empleando un espectrofotómetro (espectro maestro FISHER SCIENTIFIC 415) de acuerdo a Carrillo et al. (1998) y de manera triplicada.

7.7. Pruebas de degradación mineral y solubilización de fosfatos inorgánicos por bacterias de rizoplano

La degradación mineral se evaluó cualitativamente por observación visible y medición del halo de solubilización; para ello cada una de las cuatro cepas aisladas fueron inoculadas en placas conteniendo medio SRSM (Sundara Rao y Siha, 1963) medio modificado por Vazquez et al. (2000): la siembra se realizó en placa por extensión en superficie e incubadas a 30 y 50 °C. La observación del crecimiento bacteriano y la medición del halo a producirse (evidenciado por la clarificación del medio ocasionada por la solubilización de mineral) se realizó a las 24 hrs. La capacidad de las bacterias aisladas para disolver fosfatos también fue cuantificada siguiendo la metodología reportada por Vazquez et al., (2000).

7.8. Producción de ácidos orgánicos por *Bacillus amyloliquefaciens* aislada de rizósfera de mezquite (*Prosopis glandulosa*)

Para la determinación de producción de ácidos orgánicos volátiles y no volátiles se siguió la metodología reportada en el párrafo anterior, pero con un tiempo de incubación de 14 días y esta prueba se realizó únicamente a la bacteria *B. amyloliquefaciens*. El análisis de los ácidos producidos fue determinado por cromatografía de gases (Varian 6000 GC, Varian Instrument Group, Sunnyvale, CA, USA) siguiendo la metodología citada por Vazquez et al. (2000). La determinación se desarrolló por Accugenix (Newark, De., USA)

8. Estudio in vitro

8.1. Colecta de la semilla de *Prosopis glandulosa*

Durante el verano (junio-julio) de 2006 se colectaron vainas maduras de un árbol de mezquite chileno (*Prosopis chilensis*), ubicado en la Escuela Secundaria-Colegio América en la ciudad de Santa Ana, Sonora (paralelo 30°33' latitud norte y 111°07' longitud oeste del meridiano Greenwich, 548 m de altura sobre el nivel del mar). Posteriormente las vainas se depositaron en un recipiente térmico o hielera a 4 °C, para evitar que las semillas se infectaran por enfermedades y/o fueran consumidas por insectos. Se obtuvo la semilla cortando con tijeras la cutícula de la vaina y se procedió a extraerla de su lugar y limpiarla de impurezas, separando la semilla de los restos de las vainas. Las semillas se homogenizaron en base a tamaño y apariencia. Con el propósito de determinar la viabilidad de las semillas, se lavaron en agua potable siguiendo el criterio de flotabilidad, desechando aquellas que flotaron. Posteriormente se

desecho el agua y se adiciono un desinfectante denominado Tween 20, al 2% y se mantuvo así durante 10 minutos en agitación constante a una velocidad de 150 revoluciones por minuto (rpm) utilizando una agitadora marca EBERBACH.

Después se desecho el desinfectante Tween 20 con agua destilada estéril para eliminar los excesos del mismo. Enseguida se adiciono hipoclorito de sodio (NaClO_3) al 3% y se mantuvo así durante cinco minutos en agitación constante a una velocidad de 150 revoluciones por minuto en la misma agitadora. Por último se decanto el hipoclorito de sodio y se lavaron las semillas cinco veces con agua destilada estéril para eliminar los excedentes del hipoclorito (Carrillo et al., 1998).

8.2. Pruebas de germinación

Se preparó el cultivo de la bacteria, que presentó una fase de crecimiento exponencial (15 h); se realizó un ajuste en los cultivos bacterianos empleando un espectrofotómetro (espectro maestro FISHER SCIENTIFIC 415). La forma en que lo anterior se realizó fue acorde a Carrillo et al. (1998). Posteriormente se depositaron 5 semillas en cada una de las cajas Petri, agregando 20 mL de la solución salina correspondiente (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl). Los tratamientos se colocaron en una cámara de germinación en condiciones de luz blanca-continua, $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a $35\% \pm 1\%$ de humedad relativa. Se aplicaron volúmenes apropiados de 20 mL de agua destilada estéril, así como también de la solución salina, a los tratamientos correspondientes (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl) cada 4 días a cada una de las cajas Petri. Un total de 1500 semillas de mezquite chileno fueron tratadas por escarificación en agua hirviendo expuestas a los siguientes tiempos (0, 2, 4, 6 y 8 minutos) donde se utilizaron 300 semillas

para cada uno de los tratamientos de tiempo de la escarificación; se utilizó la bacteria *Azospirillum halopraeferens* Au4^T DSM 3675^T y la bacteria identificada de raíz y suelo de mezquite (*Prosopis glandulosa*) y un control sin inocular se usaron un total de 300 cajas petri, utilizando cinco cajas por repetición en los tratamientos de salinidad. El estudio de germinación se desarrolló durante siete días.

El porcentaje de germinación fue evaluado mediante la observación de la emergencia de la radícula (2 mm de longitud). El número de semillas germinadas se realizó mediante lecturas diarias (tasa de germinación) y finalmente el porcentaje de germinación fue determinado a los 7 días. La tasa de germinación fue calculada de acuerdo a Maguire (1962) con la ecuación:

$$M = n_1/t_1 + n_2/t_2 + \dots n_7/t_7$$

Donde $n_1, n_2, \dots, n_7$ representan el número de semillas germinadas en el tiempo $t_1, t_2, \dots, t_7$ (en días). El diseño experimental que se empleó fue un completamente al azar con 12 tratamientos, con un arreglo trifactorial 3X4X5; (2 bacterias y un control, 4 niveles de salinidad y 5 tiempos de escarificación). Utilizando este mismo diseño, se realizaron análisis de varianza del porcentaje de germinación transformando previamente los valores con arcoseno (Sokal y James, 1988). La tasa de germinación, que es la suma de semillas germinadas contadas por día también fue analizada. Cuando se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, se utilizó la prueba de Rango Múltiple de Duncan ($P < 0.05$), utilizando el programa de cómputo estadístico SAS Versión 6.12 (SAS, 2001).

8.3. Longitud radicular y altura de plántula

El periodo de observación se llevó a cabo siete días después de que culminó el estudio y se obtuvieron un total de 60 plántulas (5 plántulas por tratamiento de 12 tratamientos). Aquellas plántulas obtenidas, fueron medidas con un vernier (General, 143, General Tools, Manufacturing Co., Inc. New York, USA), procediéndose a la anotación correspondiente de las plántulas de cada tratamiento, cabe indicar que la altura de la plántula fue considerada a partir del cuello hasta el ápice de la misma.

8.4. Peso fresco de plántula de mezquite chileno (*Prosopis chilensis*)

La observación se llevó a cabo después de los siete días y se obtuvieron 48 plántulas (4 plántulas por tratamiento de 12 tratamientos). La obtención de peso fresco, se realizó mediante el uso de una balanza analítica Mettler-Toledo GmbH.

8.5. Cuantificación de células bacterianas (Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) adheridas al sistema radicular de plantas de *P. chilensis*

Esta prueba se llevó a cabo al finalizar el estudio (7 días después); para ello se tomaron de cada tratamiento y por separado, tres plantas, se lavaron con agua destilada estéril y posteriormente se introdujeron a un tubo Eppendorf con agua estéril. Se agitaron con la ayuda de un Vortex durante un minuto lo que permitió el desprendimiento de las bacterias adheridas a la raíz. Posteriormente de ésta solución se tomaron directamente 100 μ L y se sembraron por dispersión en placa en medio Rennie y/o OAB libre de nitrógeno (Rennie, 1981; Reinhold et

al., 1987). Las cajas de Petri sembradas se incubaron a 30 y 50 °C durante 24 h para cuantificar las unidades formadoras de colonia (UFC/mL). Esta prueba se realizó por triplicado.

9. Estudio en invernadero

Para la preparación de los cultivos bacterianos se desarrolló el mismo procedimiento indicado en el estudio *in vitro*. Los tratamientos evaluados fueron *A. halopraeferens* Au4^T DSM 3675^T, *B. amyloliquefaciens* y un control sin inocular, sometiéndose a cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl); para la siembra se utilizaron cinco vasos de unicel por repetición en los 12 tratamientos de salinidad, arrojando un total de 60 vasos; se utilizó el sustrato peat-moss (Sunshine, Sun Gro Horticulture Canada, Ltd.); la semilla fue obtenida y seleccionada conforme a lo indicado en este paso bajo condiciones *in vitro*; para la inoculación, en cada uno de los cultivos bacterianos se colocaron las semillas de cada tratamiento y en un matraz Kitazato de 250 mL, se sometieron por infiltración al vacío a 600 mm Hg por 5 Minutos (Carrillo et al., 1998). Posteriormente los tratamientos se sometieron a cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl); cinco vasos por repetición en los tratamientos de salinidad, arrojando un total de 60 vasos con cinco semillas cada repetición. Cada una de las semillas se sembró a una profundidad de 0.5 a 1 cm. Se agregaron 200 mL de la solución salina correspondiente (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), con una concentración del inoculante en líquido, se agregó 1×10^8 UFC/mL. Los tratamientos fueron ubicados en invernadero, a una temperatura de 35 °C con una humedad relativa de 20%. Se aplicaron volúmenes de 200 mL

de agua destilada estéril, así como también de la solución salina, a los tratamientos correspondientes (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl) cerciorándose de la existencia de un escurrimiento para evitar el incremento de salinidad; en el sustrato de los vasos; las aplicaciones fueron efectuadas cada tres días en cada uno de los vasos.

Las variables evaluadas fueron: porcentaje y tasa de emergencia, las cuales se desarrollaron tomando como criterio el rompimiento del sustrato. El número de semillas emergidas se realizó mediante lecturas diarias (tasa de emergencia) y finalmente el porcentaje de emergencia fue determinado a los 30 días. La tasa de emergencia fue calculada de acuerdo a Maguire (1962) con la ecuación:

$$M = n_1/t_1 + n_2/t_2 + \dots n_{30}/t_{30}$$

Donde $n_1, n_2, \dots n_{30}$ representan el número de semillas emergidas en el tiempo $t_1, t_2, \dots t_{30}$ (en días). El diseño experimental que se empleó fue un completamente al azar con 12 tratamientos con un arreglo trifactorial de $3 \times 4 \times 5$ (2 bacterias y un control x 4 niveles de salinidad y el tiempo de escarificación de 0, 2, 4, 6 y 8 minutos). Utilizando este mismo diseño, se realizaron análisis de varianza del porcentaje de emergencia transformando previamente los valores con arcoseno (Sokal y James, 1988). La tasa de emergencia, que es la suma de semillas emergidas contadas por día también fue analizada. Cuando se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, se utilizó la prueba de Rango Múltiple de Duncan ($P < 0.05$). Los análisis se realizaron con el programa de cómputo SAS (SAS, 2001).

9.1. Longitud radicular de plántula y altura de planta

La observación se llevo a cabo 30 días después, evaluándose 60 plantas (5 plantas por tratamiento de 12 tratamientos), que fueron medidas con un vernier (General, 143, General Tools, Manufacturing Co., Inc. New York, USA) y se procedió a la anotación de longitud radicular y altura de planta de cada tratamiento, cabe indicar que la altura de la planta fue considerada a partir del cuello hasta el ápice de la misma.

9.2. Peso fresco y Peso seco de plántula

Se evaluaron 60 plantas (5 plantas por tratamiento), para determinar el peso de fresco de planta, incluyendo raíz, y fue mediante el uso de una balanza analítica Mettler-Toledo GmbH.

Para el caso de peso seco, se evaluaron 60 plantas, considerando 5 plantas por repetición. Para obtener esta variable, las plantas se sometieron a calor en una estufa marca Shel lab modelo 1380 FM, depositándose en platos de frigolit con la finalidad de facilitar el manejo de las plantas, las mismas que se mantuvieron a una temperatura de 110 °C por espacio de 24 horas. Al término de este periodo de secado, se pesaron y se registraron los datos.

9.3. Cuantificación de células bacterianas adheridas al sistema radicular de plantas de *P. chilensis*

Esta prueba se llevó a cabo al finalizar el estudio (30 días después); se desarrolló la misma metodología indicada *in vitro*.

9.4. *Análisis bromatológicos*

Las variables evaluadas fueron: contenido de proteínas, lípidos totales y cenizas. La técnica para obtener proteínas se desarrollo por el método micro-kjeldajl; para cenizas por diferencia de peso, calcinando la muestra a 500 °C por 24 h y con relación a los lípidos totales se emplearon la técnica de Barnes y Blachstocks (1973).

10. RESULTADOS

10.1. Aislamiento de microorganismos asociados a la rizósfera de *Prosopis glandulosa*

a) Sistema radicular

De acuerdo a los aislamientos desarrollados en raíz de la planta de mezquite (*Prosopis glandulosa*), se lograron aislamientos de la rizósfera de mezquite, sobresaliendo a 0, 0.25 y 0.5 M de NaCl la colonia blanca; un limitado crecimiento fue visualizado a 0.75 M (Cuadro 1).

Cuadro 1. Colonias bacterianas aisladas de rizósfera de mezquite (*Prosopis glandulosa*) bajo cuatro concentraciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M).

M1-R	0 M de NaCl	0.25 M de NaCl	0.5 M de NaCl	0.75 M de NaCl
Rennie	400 c. blancas 6 c. amarillas	400 c. blancas 8 amarillas	500 c. amarilla 50 rosas 1 c. naranja	30 c. blancas
OAB	220 c. blancas 4 c. rosas 2 hongos	400 c. blancas 1 c. rosa	60 c. blancas	30 c. blancas
M2-R				
Rennie	200 blancas 4 c. rosa	20 c. verde 2 c. rosas	400 c. blancas	7 c. rosas 5 c. amarillas 40 c. blancas
OAB	400 c. blancas	800 c. blancas	40 c. blanca	100 c. blanca
M3-R				
Rennie	Mancha blanca	Mancha blanca	440 c. blancas	30 c. blancas 1 c. naranja
OAB	400 c. blancas	303 c. blancas	No crecimiento	200 c. blancas
M4-R				
Rennie	300 c. blanca	Mancha blanca	600 c. blancas 1 hongo verde	2 amarillas 30 blancas
OAB	600 c. blancas	800 c. blanca	10 c. blanca	No crecimiento
M5-R				
Rennie	Mancha blanca	200 c. blancas	210 c. blancas	10 c. amarilla 10 c. blanca 1 c. rosa
OAB	310 c. blancas	600 c. blancas	No crecimiento	No crecimiento

c: colonias bacterianas.

M1, 2, 3, 4 y 5-R: muestras de raíz.

OAB y RENNIE: medios de cultivo libres de nitrógeno,

Se desarrolló una segunda repetición de los aislamientos de rizósfera de mezquite (*Prosopis glandulosa*), y se apreció que las colonias blancas tuvieron un crecimiento a las cuatro salinidades expuestas, comparadas con aquellas de color amarillo, rosa y cristalino. La colonia blanca en el segundo ensayo, mostró un similar comportamiento al primero (1er ensayo) de bajo crecimiento a una salinidad de 0.75 M de NaCl (Cuadro 2).

Cuadro 2. Colonias bacterianas aisladas de rizósfera de mezquite (*Prosopis glandulosa*) bajo cuatro concentraciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M).

M1-R	0 M de NaCl	0.25 M de NaCl	0.5 M de NaCl	0.75 M de NaCl
Rennie	100 C. blancas	7 c. naranjas 6 c. cremas 400 c. blancas 2 c. amarillas	203 c. blancas 100 c. amarillas	2 c. amarillas 20 c. blancas
OAB	106 c. blancas 3 c. rosas	200 c. cristalinas 100 c. blancas	120 c. blancas	30 c. blancas
M2-R				
Rennie	300 c. blancas	140 c. blancas 2 c. amarillas	300 c. blancas	10c. amarillas 30 c. blancas
OAB	200 c. blancas	500 c. blancas Cristalinas	No crecimiento	No crecimiento
OAB	Poco crecimiento de c. blancas	200 c. blancas Cristalinas	No crecimiento	No crecimiento
M3-R				
Rennie	350 c. blancas	260 c. blancas	430 c. blancas	30 c. blancas
OAB	200 c. blancas	600 c. blancas	No crecimiento	No crecimiento
M4-R				
Rennie	600 c. blancas	50 c. blancas 2 c. amarilla	500 c. blancas	3 c. amarillas 30 blancas
OAB	300 c. blancas Cristalinas	600 c. blancas	No crecimiento	No crecimiento
M5-R				
Rennie	400 c. blancas	200 c. blancas 30 c. amarillas	210 c. blanca	No crecimiento
OAB	300 c. blancas Cristalinas	300 c. blanca Cristalina	300 c. blancas	No crecimiento

c: colonias bacterianas.

M1, 2, 3, 4 y 5-R: muestras de raíz.

OAB y RENNIE: medios de cultivo libres de nitrógeno,

b) Suelo adherido

Se realizaron dos ensayos de aislamiento de bacterias de suelo y se contaron las colonias presentes. Siendo la colonia blanca, la que presentó un desarrollo favorable en las cuatro salinidades. Sin embargo, en la salinidad de 0.75 M de NaCl, se presentó una disminución de crecimiento y presencia de la colonia blanca (Cuadro 3).

Cuadro 3. Colonias bacterianas aisladas de suelo de mezquite (*Prosopis glandulosa*) bajo cuatro concentraciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M).

M1-S	0 M de NaCl	0.25 M de NaCl	0.5 M de NaCl	0.75 M de NaCl
Rennie	Mancha c. blanca	Mancha c. blanca	40 c. blancas	40 c. blancas
OAB	No crecimiento	100 c. blancas	No crecimiento	No crecimiento
M2-S				
Rennie	10 c. blancas 1 c. amarilla	Mancha c. blanca	80 c. blancas	120 c. blancas
M3-S				
Rennie	Mancha c. blanca 1 c. amarilla	Mancha c. blanca	No crecimiento	200 c. blancas
OAB	Mancha c. blanca	No crecimiento	No crecimiento	No crecimiento
M4-S				
Rennie	200 c. blancas	Mancha c. blanca	300 c. blancas	300 c. blancas
OAB	No crecimiento	No crecimiento	No crecimiento	No crecimiento

c: colonias bacterianas.

M1, 2, 3, 4 y 5-S: muestras de suelo.

OAB y RENNIE: medios de cultivo libres de nitrógeno,

10.2. Conservación y preservación de los aislados bacterianos de raíz y suelo de mezquite (*Prosopis glandulosa*)

Las colonias aisladas se depositaron en conservación en tubos utilizando como medio de preservación el agua destilada estéril, glicerol 15% y en solución salina al 0.85% (Cuadros 1 y 2), utilizando tubos de ensayo y tapones con algodón. Se utilizaron 41 tubos para los aislados bacterianos de raíz y 33 tubos para aquellos aislados de suelo. Las colonias bacterianas fueron almacenadas en los tubos de acuerdo a la salinidad donde se desarrollaron (Cuadro 4).

Cuadro 4. Colonias bacterianas de suelo y rizósfera puestas en conservación, bajo condiciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M).

Suelo			
0 M de NaCl	0.25 M de NaCl	0.5 M de NaCl	0.75 M de NaCl
1 c. blanca	1 c. blanca	1 c. blanca	1 c. blanca
2 c. amarilla	2 c. crema	2 c. amarilla	2 c. rosa
	3 c. rosa	3 c. rosa	
Rizósfera			
0 M de NaCl	0.25 M de NaCl	0.5 M de NaCl	0.75 M de NaCl
1 c. blanca	1 c. blanca	1 c. blanca	1 c. blanca
2 c. amarilla	2 c. amarilla	2 c. amarilla	2 c. amarilla
3 c. naranja		3 c. naranja	3 c. naranja
		4 c. rosa	

c: colonias bacterianas.

10.3. Muestreo para análisis de suelo fuera del dosel de mezquite

Conforme a los estudios físico-químicos de suelo, donde se desarrolla el mezquite *P. glandulosa* en los cráteres de volcanes presentes en la zona del pinacate, estos indican de nula a baja presencia de fuente de nitrógeno en las muestras 1, 3, 4 y 6 (Cuadro 5); cabe indicar que dichas muestras, fueron obtenidas fuera del dosel de los mezquites *P. glandulosa*. Por su parte muestras

2 y 5 que fueron extraídas de dentro del dosel de los mezquites, los niveles de nitrógeno en ppm fueron superiores en comparación de aquellas que fueron colectadas fuera del dosel. De igual forma en el cuadro 5, se muestran los resultados de análisis, donde el fósforo de las muestras 2 y 5 indica niveles superiores con respecto a las muestras 1, 3, 4 y 6. Respecto al calcio, los resultados en las muestras 1, 2, 3 y 5 indican altos niveles en comparación con las muestras 4 y 6. El Mg por su parte, presentó altos niveles en la muestras 3. Acorde al factor sodio todas las muestras presentaron similares resultados, mientras que con el elemento potasio sobresalieron las muestras 2, 3 y 5 (Cuadro 5).

La capacidad de intercambio catiónico (CIC) que indicaron los análisis mostraron que la muestra 3 sobresalió de las restantes muestras. Sin embargo la muestra 6 fue la que resultó con el nivel más bajo (Cuadro 5).

En el % de cationes intercambiables la muestra 3, es la que presentó niveles adecuados de Calcio, en comparación con las demás muestras. Por su parte el Magnesio todas las muestras indicaron niveles bajos considerando el rango de niveles adecuados de un suelo arable (Cuadro 5). Acorde al elemento Sodio (Na) en % de cationes intercambiables las muestras muestran valores altos; un similar comportamiento fue observado en el elemento Potasio, donde ligeramente la muestra procedente de “cerro colorado” y la muestra 5 sobrepasan el valor mínimo de Potasio intercambiable en un suelo arable.

En el % SAT (porcentaje de saturación) las muestras 2, 3, 5 y 6 estuvieron dentro de los niveles permitidos en comparación con las demás muestras.

Respecto al pH los resultados indican que solo la muestra 2, mostró un pH por debajo de 7; no obstante ello, la muestra 3 y 6 sobrepasan el pH adecuado, considerando el nivel óptimo en que un suelo agrícola debe tener (Cuadro 5).

De igual forma, el análisis correspondiente a la conductividad eléctrica (C. E.) las muestras 2 y 5 presentaron una alta C. E. Respecto al nivel adecuado de un suelo arable; el resto de las muestras analizadas indicaron niveles permitidos de C. E. (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis físico químico del suelo obtenido en mezquite (*Prosopis glandulosa*) dentro y fuera del dosel del mezquite.

MUESTRA	ANÁLISIS DE SUELO ppm (mg/Kg suelo)						C.I.C. mEq/100gm	% Cationes Intercambiables			
	N-NO3	P	Ca	Mg	Na	K		Ca	Mg	Na	K
1) 0 – 30 afuera del mezquite (39°)	7.0	12.25	2523	107	3266	238	28.31	44.54	3.14	50.15	2.15
2) 0 – 30 primer mezquite.	98.0	40.60	2520	240	1902	426	23.96	52.62	8.34	34.47	4.54
3) 0 – 30 cerro colorado.	6.5	11.50	10,000	402	1887	1426	65.20	76.68	5.13	12.57	5.59
4) 0 – 30 suelo volcánico.	3.0	10.15	1484	109	2765	108	20.62	35.98	4.00	58.53	1.35
5) 0 – 30 segundo mezquite.	100.0	61.25	2854	237	2446	571	28.33	50.37	6.95	37.52	5.15
6) 0-03 primera capa suelo volcánico	2.5	12.60	963	121	2367	62	16.27	29.56	6.20	63.20	0.98
<i>*Niveles adecuados</i>	30	30	2000	350	<250	350	20-40	70-80	10-20	<5	5-10
MUESTRA	% SAT	pH	C.E.								
1) 0 – 30 afuera del mezquite (39°)	17.0	7.89	1.26								
2) 0 – 30 primer mezquite.	26.0	6.86	5.07								
3) 0 – 30 cerro Colorado.	28.0	8.10	0.59								
4) 0 – 30 suelo Volcánico.	19.25	7.94	1.03								
5) 0 – 30 m1 segundo mezquite.	30.51	7.37	14.0								
6) 0-03 Primera capa suelo volcánico	37.33	8.35	0.47								
<i>*Niveles adecuados</i>	20-40	7.00	1.5								

** Niveles de referencia para suelos de utilización agrícola* (Aguilar et al., 1987; Universidad autonoma de Chiapas, 2001)

10.4. Determinación de la capacidad de fijación de nitrógeno por las bacterias aisladas

Del total de aislados bacterianos que fueron obtenidos de raíz y suelo. 19 colonias aisladas fueron sometidas a la prueba de reducción de acetileno, lo anterior a características morfológicas coloniales y morfología celular (color, consistencia, apariencia, superficie, elevación, crecimiento, motilidad, tinción Gram y forma) acorde a Manovsky (1982).

En los resultados de la prueba de reducción de acetileno se observó que sólo cuatro de las colonias mostraron un alto pico de producción de etileno, las cuales fueron seleccionadas para llevar a cabo la identificación del 16S Ribosomal. El cromatograma (Figura 1) muestra la actividad de reducción de acetileno de cepas asociadas a *P. glandulosa*, que se desarrollan en los cráteres de volcanes de la Reserva de la Biosfera el Pinacate y Gran Desierto de Altar, comparándola con el control *Azospirillum halopraeferens* (Figura 1).

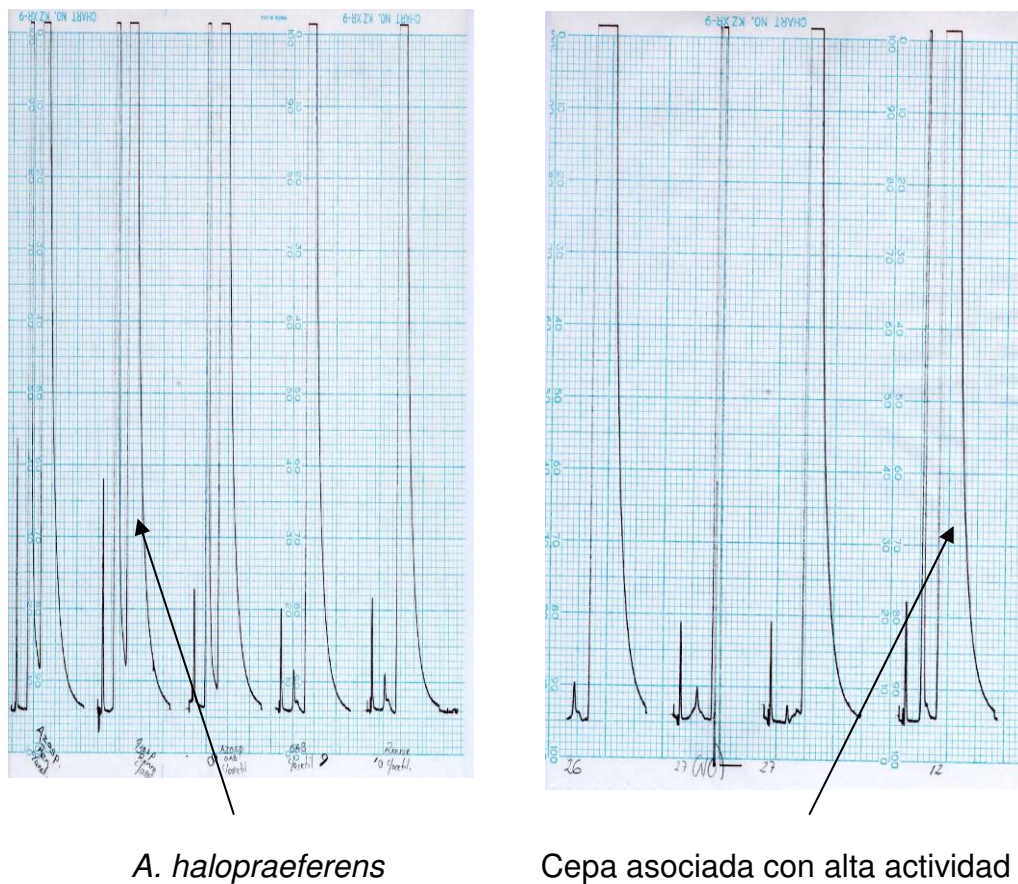


Figura 1. Cromatograma mostrando la actividad de reducción de acetileno de la bacteria asociada a *Prosopis glandulosa* comparandola con *Azospirillum halopraeferens*.

10.5. Caracterización de los potenciales aislados bacterianos mediante 16S rRNA

De los asilados bacterianos que mostraron altos niveles de fijación de nitrógeno y aquellos de mayor frecuencia en base a color, cuatro aislados bacterianos fueron seleccionados, para desarrollar las subsecuentes evaluaciones.

Los cuatro aislados bacterianos fueron caracterizados mediante 16S ribosomal, mostrando los siguientes resultados:

1. *Bacillus amyloliquefasciens*; colonia blanca (Figura 2).
2. *Kocuria polaris*; colonia rosa (Figura 3).
3. *Planococcus antarticus* colonia naranja (Figura 4).
4. *Rhodococcus fascians* colonia amarilla (Figura 5).

a)

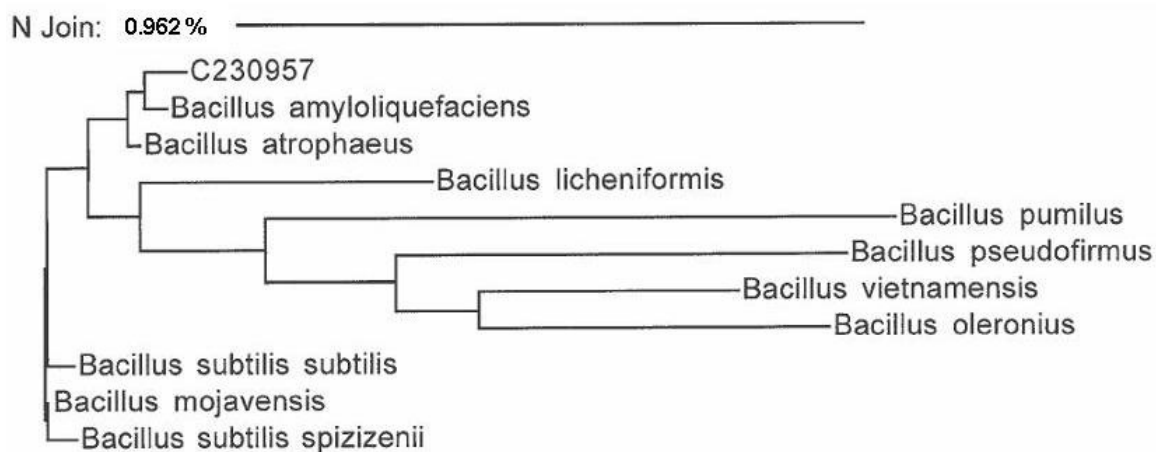


Figura 2. Identificación del 16S rRNA de la bacteria fijadora de nitrógeno aislada de la rizósfera de *Prosopis glandulosa* que presentó una colonia blanca.

b)

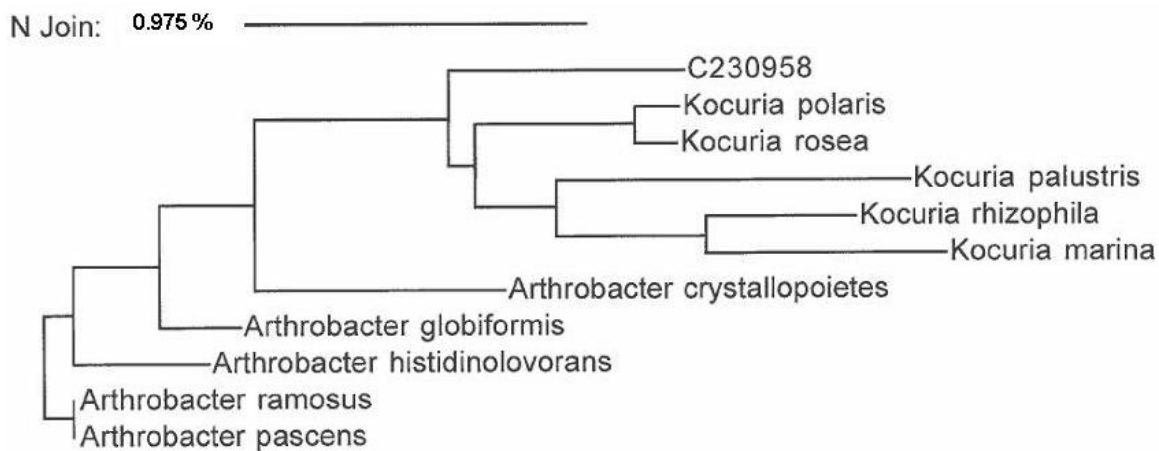


Figura 3. Identificación del 16S rRNA de la bacteria fijadora de nitrógeno aislada de la rizósfera de *Prosopis glandulosa* que presentó una colonia rosa.

c)

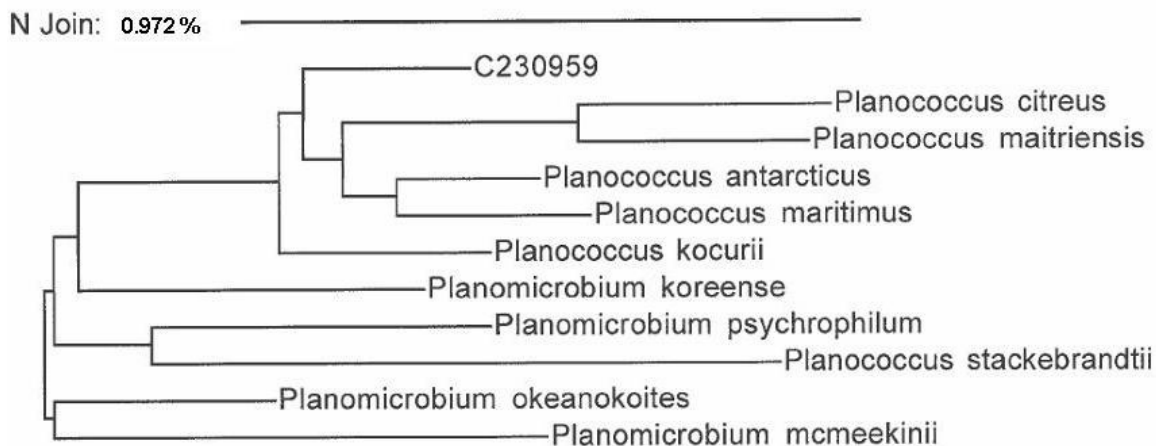


Figura 4. Identificación del 16S rRNA de la bacteria fijadora de nitrógeno aislada de la rizósfera de *Prosopis glandulosa* que presentó una colonia naranja.

d)

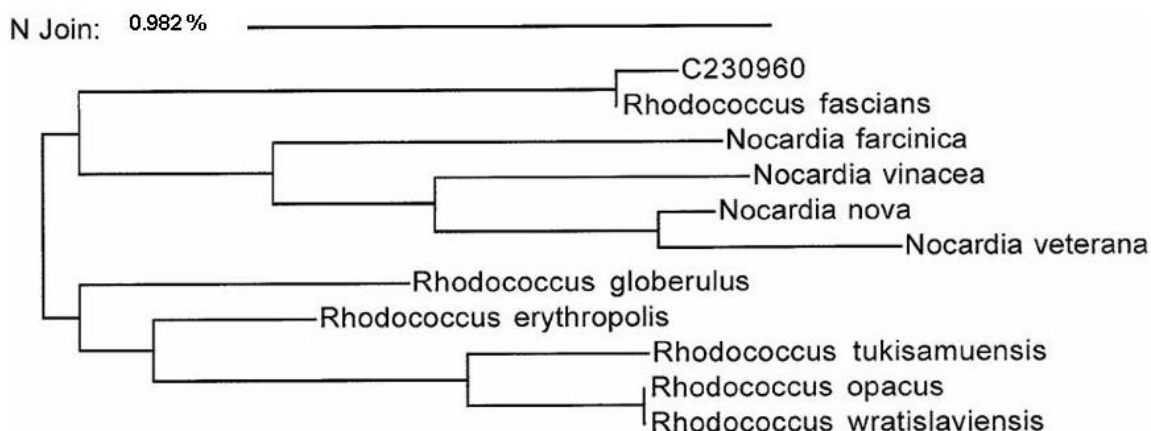


Figura 5. Identificación del 16S rRNA de la bacteria fijadora de nitrógeno aislada de la rizósfera de *Prosopis glandulosa* que presentó una colonia amarilla.

10.6. Cinética bacteriana de aislados potenciales bajo condiciones de salinidad y temperatura

Los resultados obtenidos en esta prueba, indican que *B. amyloliquefaciens* mostró un similar crecimiento en las dos temperatura (30 y 50 °C) y cuatro concentraciones salinas de (0 M, 0.25 M, 0.5 M y 0.75 M de NaCl) utilizadas (Cuadro 6).

Respecto a *K. polaris* este microorganismo se desarrolló a una temperatura de 30 °C y con una salinidad de 0 y 0.25 M de NaCl; a 50 °C solo tuvo presencia a 0 M de NaCl.

Un similar comportamiento a *K. polaris* lo tuvo *P. antarcticus*, arrojando un resultado de crecimiento a 30 °C a una salinidad de 0.25 y 0.75 M de NaCl a 50 °C (Cuadro 6).

La bacteria *R. fascinas* tuvo un crecimiento a una temperatura de 30 °C en todas las salinidades probadas, mostrando diferencia significativa en UFC/mL

a 0.25 M de NaCl. A una temperatura de 50 °C, únicamente tuvo crecimiento a 0 y 0.25 M de NaCl (Cuadro 6).

Cuadro 6. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Kocuria polaris*, *Planococcus antarcticus* y *Rhodococcus fascians* sometidas a dos pruebas de temperatura y cuatro concentraciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M).

Temperatura	Salinidad M de NaCl	Log ₁₀ UFC/mL	Bacteria
30 °C	0	96 f	<i>Bacillus</i>
30 °C	0.25	106 c	<i>Bacillus</i>
30 °C	0.5	12 i	<i>Bacillus</i>
30 °C	0.75	11 i	<i>Bacillus</i>
50 °C	0	172 d	<i>Bacillus</i>
50 °C	0.25	582 b	<i>Bacillus</i>
50 °C	0.5	47 g	<i>Bacillus</i>
50 °C	0.75	1 j	<i>Bacillus</i>
30 °C	0	0 k	<i>Kocuria</i>
30 °C	0.25	480 c	<i>Kocuria</i>
30 °C	0.5	1583 a	<i>Kocuria</i>
30 °C	0.75	0 k	<i>Kocuria</i>
50 °C	0	33 h	<i>Kocuria</i>
50 °C	0.25	0 k	<i>Kocuria</i>
50 °C	0.5	0 k	<i>Kocuria</i>
50 °C	0.75	0 k	<i>Kocuria</i>
30 °C	0	1 j	<i>Planococcus</i>
30 °C	0.25	2 g	<i>Planococcus</i>
30 °C	0.5	0 k	<i>Planococcus</i>
30 °C	0.75	3 g	<i>Planococcus</i>
50 °C	0	0 k	<i>Planococcus</i>
50 °C	0.25	0 k	<i>Planococcus</i>
50 °C	0.5	0 k	<i>Planococcus</i>
50 °C	0.75	0 k	<i>Planococcus</i>
30 °C	0	297 d	<i>Rhodococcus</i>
30 °C	0.25	4600 a	<i>Rhodococcus</i>
30 °C	0.5	4267 b	<i>Rhodococcus</i>
30 °C	0.75	3667 c	<i>Rhodococcus</i>
50 °C	0	67 f	<i>Rhodococcus</i>
50 °C	0.25	100 e	<i>Rhodococcus</i>
50 °C	0.5	0 k	<i>Rhodococcus</i>
50 °C	0.75	0 k	<i>Rhodococcus</i>

Las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

10.7. Pruebas de degradación mineral y solubilización de fosfatos inorgánicos por bacterias de rizoplasma

En las pruebas de solubilización a temperatura de 30 y 50 °C, se evaluó cualitativamente por observación visible y de manera cuantitativa por medición del halo de solubilización. El género *Bacillus* en ambas temperaturas mostró halos que midieron en promedio 4 mm en medio sólido Henderson y Duff, a una salinidad de 0 y 0.25 M de NaCl, valores que conforme se incrementó la salinidad en los medios, se vieron disminuidos (Figura 6). La observación del crecimiento bacteriano y la medición del halo que se produjo, se marco como positiva la bacteria para solubilizar fosfatos (evidenciado por la clarificación del medio ocasionada por la solubilización de mineral) (Figura 7). También se utilizó el medio específico llamado SRSM (Sundara Rao y Sinha, 1963) modificado por (Vazquez et al., 2000), donde se apreció perfectamente la solubilización de fosfatos por la *B. amyloliquefaciens* (Figura 7) ya que en el medio se presentó un cambio de color donde nos indica que la bacteria es solubilizadora de fosfatos.



Figura 6. Solubilización de fosfatos de aislamientos bacterianos de rizósfera de *Prosopis glandulosa* sobre medio Henderson y Duff (1963).

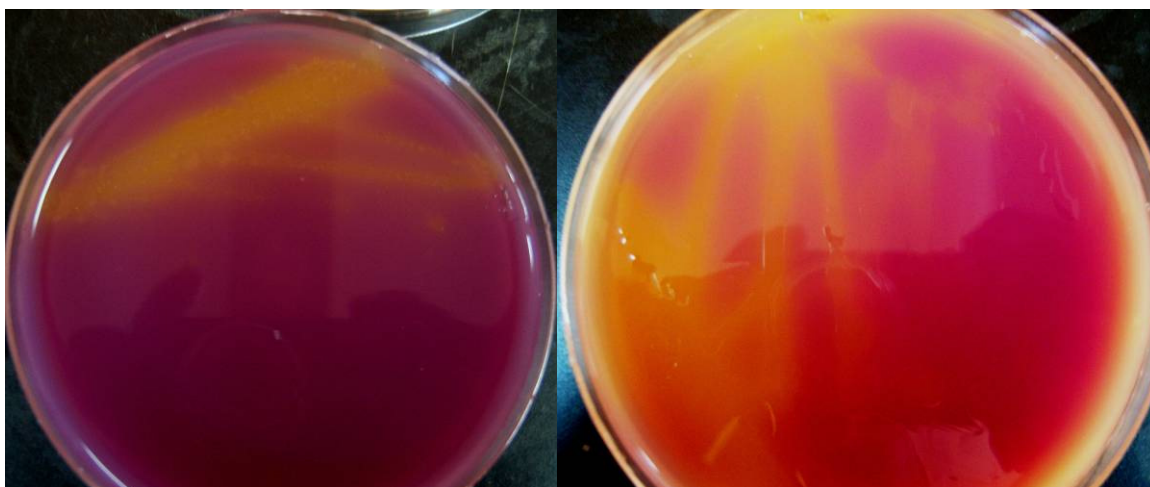


Figura 7. Solubilización de fosfatos de aislamientos bacterianos de rizósfera de *Prosopis glandulosa* sobre medio SRSM donde se ve el cambio de color, que indica el incremento de solubilización de fosfatos.

La bacteria *R. fascians*, solamente mostró una diferencia significativa de solubilización de fosfatos cuando fue sometida a una temperatura de 30 °C en una salinidad de 0.5 M de NaCl. Por su parte las dos restantes bacterias *K. polaris* y *P. artarcticus*, mostraron valores inferiores en comparación de *B. amyloliquefaciens* *R. fascians* en ambas temperaturas (Cuadro 7).

Cuadro 7. Solubilización de fosfatos de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Rhodococcus fascians*, *Kocuria polaris* y *Planococcus artarcticus*, en medio de cultivo SRSM, bajo condiciones de salinidad (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl) y dos temperaturas (30 y 50° C).

BACTERIA	SALINIDAD							
	0		0.25		0.5		0.75	
	Temperatura y medida de halos (mm)							
	30°	50°	30°	50°	30°	50°	30°	50°
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	4.00 a	3.67 a	4.00 a	2.00 a	0.67 c	1.00 b	1.87 a	1.67 a
<i>Rhodococcus fascians</i>	1.00 d	1.67 c	1.30 d	1.33 d	2.00 a	0.33 c	1.00 b	1.33 b
<i>Kocuria polaris</i>	1.33 c	3.33 b	1.67 c	1.67 b	1.33 b	1.00 b	0.33 c	1.00 c
<i>Planococcus artarcticus</i>	2.33 b	1.67 c	2.67 b	1.33 c	0.67 c	1.33 a	0.00 d	1.33 b

Las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

10.8. Producción de ácidos orgánicos por bacterias aisladas de rizósfera de mezquite (*Prosopis glandulosa*)

La bacteria *B. amyloliquefaciens* produjo los siguientes ácidos orgánicos volátiles: ácido acético, ácido isobutírico, ácido isovalérico: los resultados en ácidos orgánicos no volátiles se detectaron el ácido láctico y ácido succínico.

11. Estudio in vitro

11.1. Germinación in vitro a un tiempo de escarificación de 0 minutos

De acuerdo a los resultados obtenidos considerando cero minutos de escarificación, se observó que el mejor % de germinación lo tuvo el tratamiento con la bacteria *B. amyloliquefaciens* y el tratamiento control de mezquite chileno a una salinidad de 0.25 M de NaCl (40% y 38% respectivamente), presentando diferencias significativas en comparación de los restantes tratamientos. Cuando los tratamientos se vieron sujetos a una salinidad de 0.5 M de NaCl tuvieron un menor porcentaje de germinación; a 0.75 M de NaCl se inhibió la germinación de la semilla de mezquite chileno en todos los tratamientos (Figura 8).

11.2. Tasa de germinación a un tiempo de escarificación de 0 minutos

Los resultados obtenidos del tratamiento control en la tasa de germinación a 0 minutos de escarificación, considerando las 4 concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), la Figura 9, muestra como a una salinidad de 0.25 supera numéricamente a las demás salinidades; un resultado significativo con $P < 0.05$ fue con las salinidades de 0.5 y 0.75 M de NaCl (Figura 9).

Acorde a la tasa de germinación considerando el tratamiento de *A. halopraeferens* a 0 minutos y con las cuatro salinidades se logró observar que este tratamiento es favorecido cuando la semilla de mezquite es sujeta a una salinidad de 0.5 M de NaCl (Figura 9).

Por su parte el tratamiento donde se considera a la inoculación de *B. amyloliquefaciens*, la tasa de germinación mostró diferencia significativa en los tratamientos a una salinidad de 0 y 0.5 M de NaCl en comparación con las salinidades de 0.25 y 0.75 M de NaCl (Figura 9).

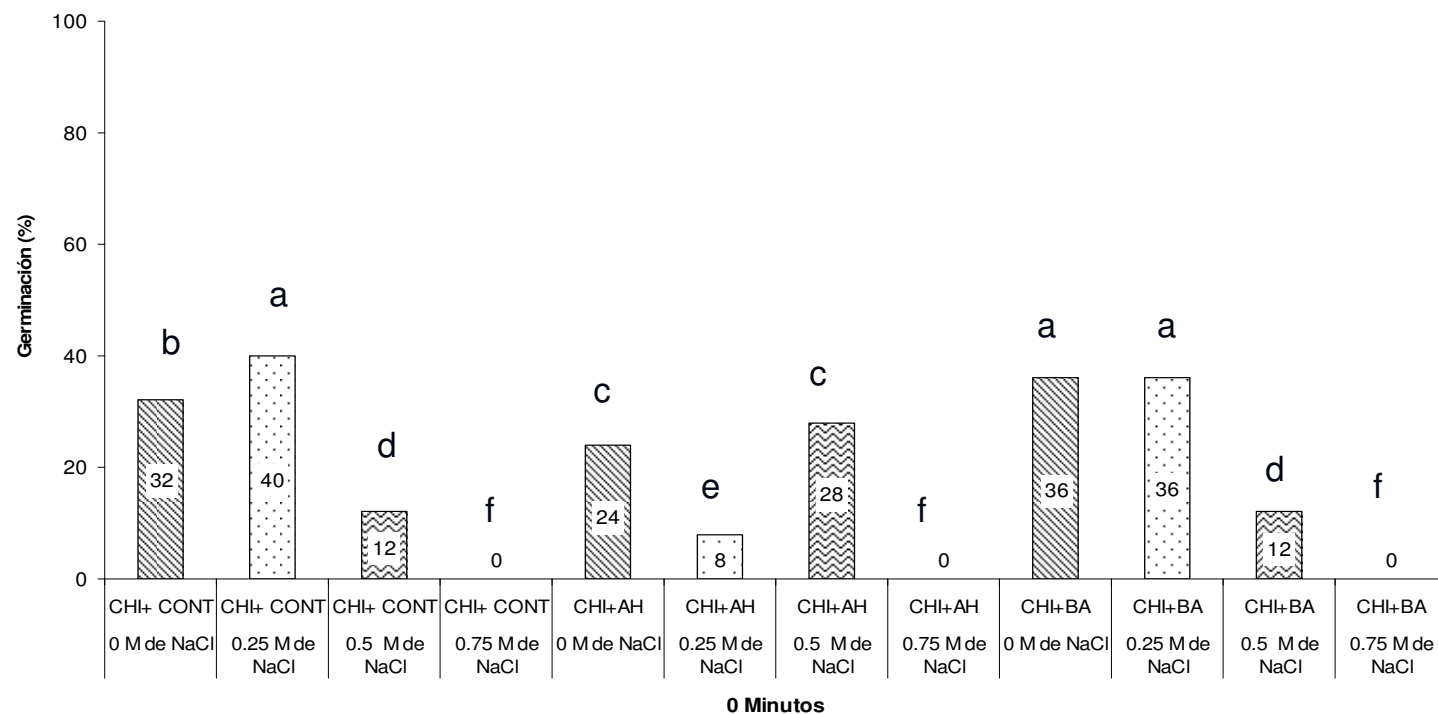


Figura 8. Porcentaje de germinación (%) de *Prosopis chilensis* con tiempo de escarificación de 0 minutos, (CHI= semilla de mezquite chileno, CONT=control, inoculantes AH= *Azospirillum halopraeferens*, BA= *Bacillus amyloliquefaciens*), bajo cuatro concentraciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M), letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

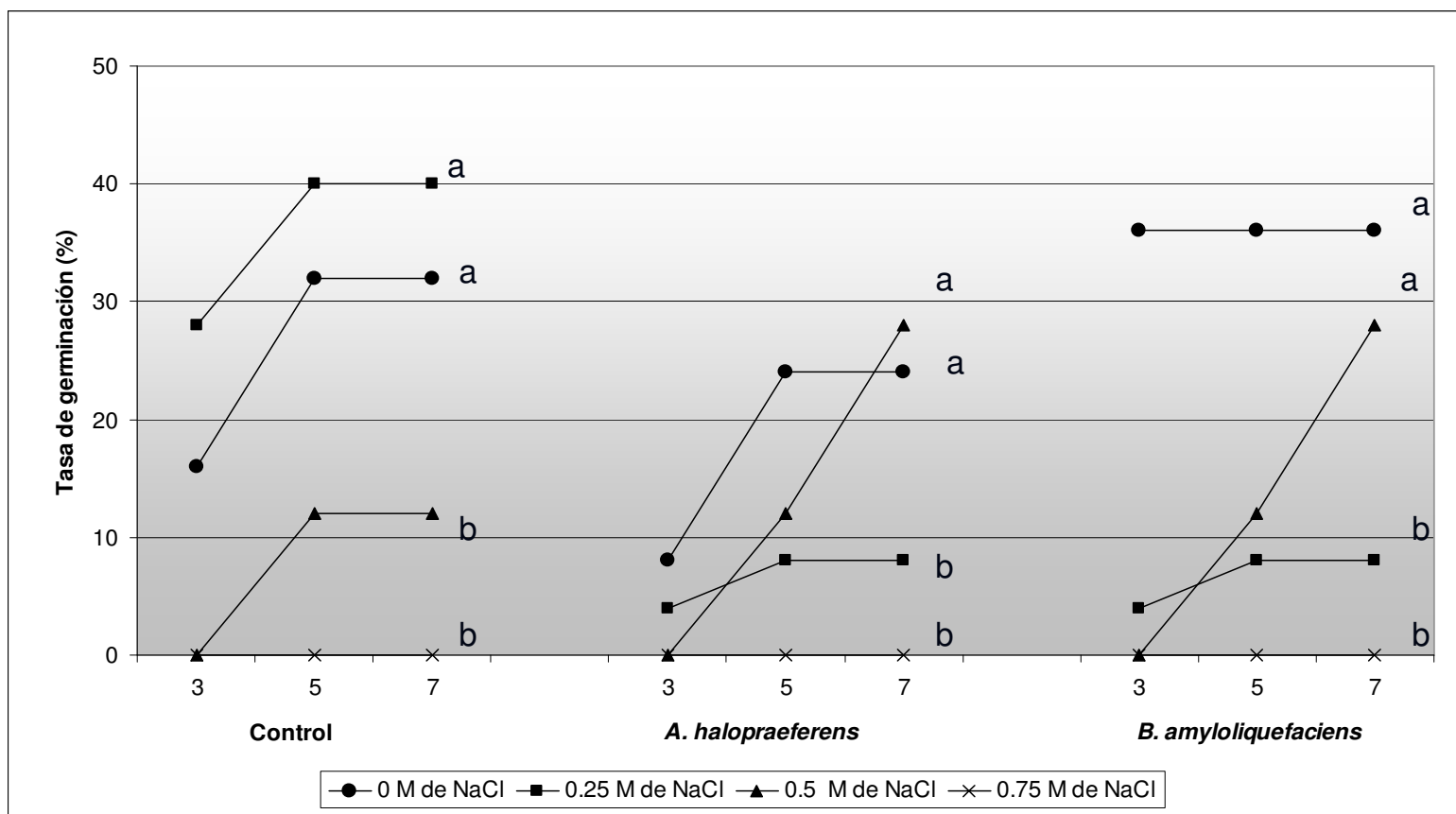


Figura 9. Efecto de la Tasa de emergencia (%) de *Prosopis chilensis*, por *Azospirillum halopraeferens* y *Bacillus amyloliquefaciens*, con su respectivo control sin inoculante bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), a un tiempo de escarificación de cero minutos; las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

11.3. Longitud radicular y altura de plántula a un tiempo de escarificación de 0 minutos

Los resultados de altura y longitud radicular con un tiempo de escarificación de 0 minutos y cuatro salinidades de (0 M, 0.25 M, 0.5 M y 0.75 M de NaCl), se obtuvo que el tratamiento control mostró valores significativos en la variable altura a una salinidad de 0 M de NaCl, en comparación con los demás tratamientos. Sin embargo, conforme se incrementó la salinidad, la misma variable altura se favorece con la inoculación de *B. amyloliquefaciens*. En la variable longitud radicular, de igual forma el tratamiento inoculado con *B. amyloliquefaciens* mostró valores significativos a 0 y 0.25 M de NaCl (Cuadro 8).

11.4. Peso fresco de plántula de mezquite chileno (*Prosopis chilensis*) a un tiempo de escarificación de 0 minutos

Bajo las cuatro concentraciones de salinidad probadas con *A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens* mostraron igualdad con $P < 0.05$, a una salinidad de 0 M de NaCl en comparación con el control (Cuadro 8).

11.5. Cuantificación de células bacterianas (Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) adheridas al sistema radicular de plantas de *P. chilensis* con un tiempo de escarificación de 0 minutos

Los resultados muestran que a un tiempo de escarificación de 0 minutos las dos bacterias muestran afinidad a la planta de mezquite chileno, esto último debido a la presencia de bacterias adheridas al sistema radicular de las plántulas

de mezquite chileno. Se pudo observar mayor número de UFC/mL con diferencia significativa en los tratamientos sujetos a una salinidad de 0 M de NaCl en comparación de las restantes concentraciones salinas (Cuadro 8).

Cuadro 8. Efecto de la inoculación de *Azospirillum halopraeferens*=AH y *Bacillus amyloliquefaciens*=BA, y su respectivo control=C sin inoculante en plántulas de *Prosopis chilensis*, bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), con un tiempo de escarificación de la semilla de *Prosopis chilensis* de cero minutos.

Inoculante	M NaCl	Altura de plántula (cm)	Longitud radicular (cm)	Peso fresco (mg)	UFC/mL
C	0	10.80 a	3.90 c	0.37 c	0
C	0.25	8.80 b	4.20 c	0.44 b	0
C	0.5	3.78 c	1.70 d	0.32 c	0
C	0.75	0.00 e	0.00 f	0.00 d	0
AH	0	7.90 c	6.10 b	0.55 a	3700 a
AH	0.25	2.10 d	0.36 e	0.17 c	3300 b
AH	0.5	2.88 d	0.96 e	0.33 c	3000 b
AH	0.75	0.00 e	0.00 f	0.00 d	2067 c
BA	0	9.40 b	8.58 a	0.56 a	3700 a
BA	0.25	8.90 e	6.10 b	0.35 c	3467 b
BA	0.5	3.78 c	1.36 d	0.31c	2800 c
BA	0.75	0.00 e	0.00 f	0.00 d	2512 c

Altura de plántula, longitud radicular, peso fresco de plántula.

UFC/mL: Unidades formadoras de colonias adheridas al sistema radicular.

Las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

12. Germinación *in vitro* a un tiempo de escarificación de 2 minutos

Acorde a los resultados obtenidos a un tiempo de escarificación de 2 minutos, el tratamiento sin inoculante presentó el máximo valor en la variable % de germinación a 0 M de NaCl (72%). No obstante ello, conforme la salinidad se incrementó, los tratamientos inoculados con la bacteria *A. halopraeferens* resultaron ser mejores en comparación de los restantes tratamientos considerando salinidad e inoculante (Figura 10).

12.1. Tasa de germinación a un tiempo de escarificación de 2 minutos

La figura 11 indica que la tasa de germinación considerando un tiempo de escarificación de 2 minutos y las cuatro salinidades, en el tratamiento control mostró un resultado significativo cuando fue tratado en ausencia de NaCl. Conforme se incrementa la salinidad, la tasa de germinación es afectada negativamente (Figura 11).

Por su parte la tasa de germinación en un tiempo de escarificación de 2 minutos con la inoculación de la bacteria *A. halopraeferens*, los resultados indican que esta variable (tasa de germinación) no mostró resultados significativos a 0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl (Figura 11).

Un similar comportamiento en tasa de germinación a una escarificación de 2 minutos con aquellos tratados con la bacterias *B. amyloliquefaciens* (Figura 11).

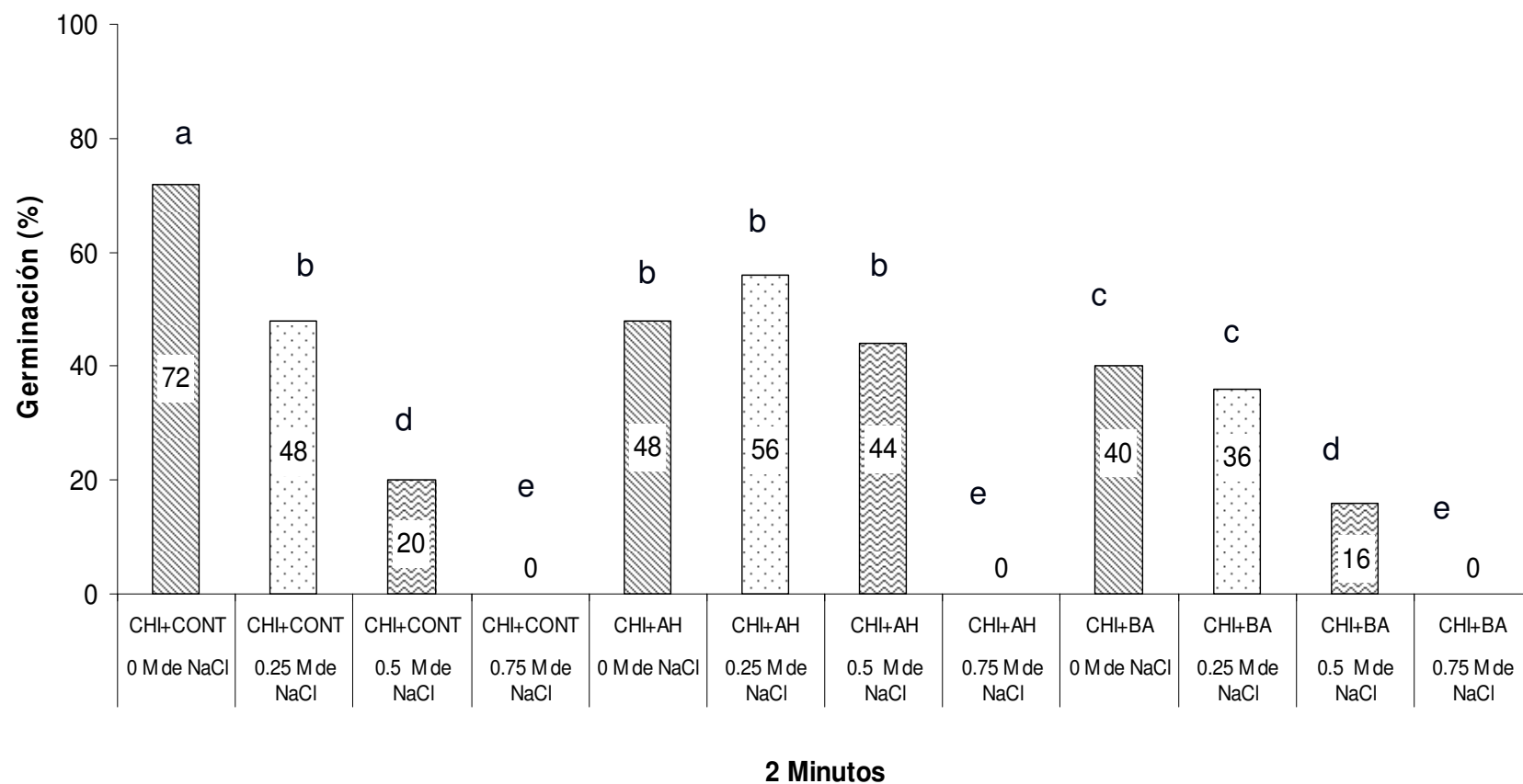


Figura 10. Porcentaje de germinación (%) de *Prosopis chilensis* con tiempo de escarificación de 2 minutos, (CHI= semilla de mezquite chileno, CONT=control, inoculantes AH= *Azospirillum halopraeferens*, BA= *Bacillus amyloliquefaciens*), bajo cuatro concentraciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M), las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

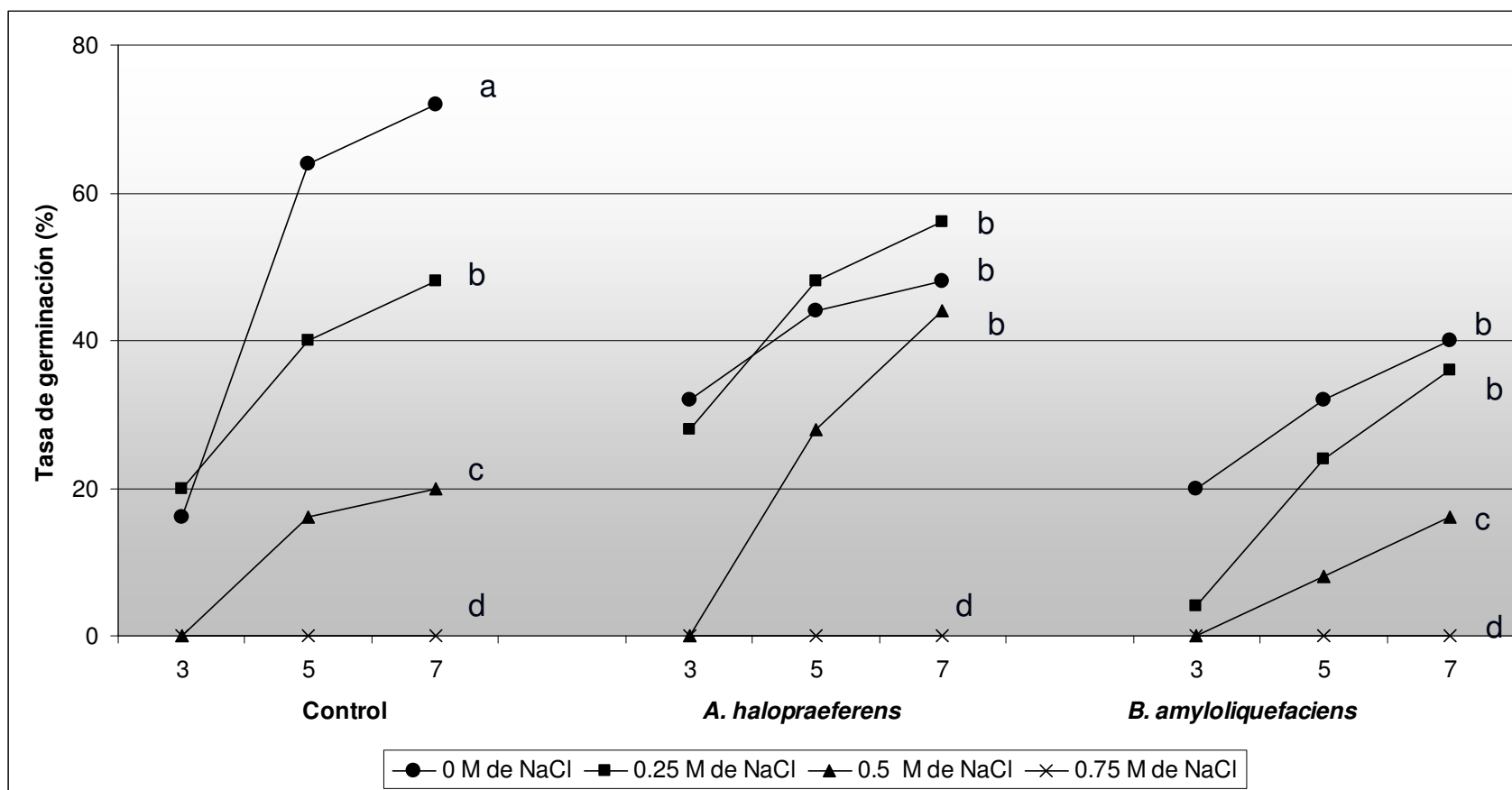


Figura 11. Efecto de la Tasa de germinación (%) de *Prosopis chilensis*, por *Azospirillum halopraeferens* y *Bacillus amyloliquefaciens*, con su respectivo control sin inoculante bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), a un tiempo de escarificación de dos minutos, las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

12.2. Longitud radicular y altura de plántula a un tiempo de escarificación de 2 minutos

Los resultados obtenidos en altura y longitud radicular a un tiempo de escarificación de 2 minutos con las salinidades de 0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl y con las bacterias *A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens*, en la variable altura el tratamiento con *B. amyloliquefaciens* mostró el valor más alto, seguido del tratamiento control y *A. halopraeferens* (13.22, 12.20 y 10.33 respectivamente). En longitud radicular a una salinidad de 0 M, el control presentó diferencia significativa en comparación con los demás tratamientos (Cuadro 9).

12.3. Peso fresco de plántula de mezquite chileno (*Prosopis chilensis*) a un tiempo de escarificación de 2 minutos

El cuadro 9, indica que el tratamiento que mostró diferencia significativa fue aquel inoculado con *A. halopraeferens* a una salinidad de 0 M de NaCl, siguiéndole en segundo orden, el inoculado con *B. amyloliquefaciens* y el control (0.52, 0.47 y 0.46 respectivamente). Conforme se incremento la salinidad el peso fresco disminuyó (Cuadro 9).

12.4. Cuantificación de células bacterianas (Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) adheridas al sistema radicular de plantas de *P. chilensis* con un tiempo de escarificación de 2 minutos

A una salinidad de 0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl la bacteria *A. halopraeferens* presentó diferencia significativa en comparación del tratamiento *B. amyloliquefaciens* (Cuadro 9); a una salinidad de 0 M de NaCl, ambas bacterias mostraron igualdad con $P < 0.05$.

Cuadro 9. Efecto de la inoculación de *Azospirillum halopraeferens*=AH y *Bacillus amyloliquefaciens*=BA, y su respectivo control=C sin inoculante en plántulas de *Prosopis chilensis*, bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), con un tiempo de escarificación de la semilla de *Prosopis chilensis* de dos minutos.

Inoculante	M NaCl	Altura de plántula (cm)	Longitud radicular (cm)	Peso fresco (mg)	UFC/mL
C	0	12.20 a	9.06 a	0.46 b	0
C	0.25	6.10 c	2.50 c	0.39 c	0
C	0.5	3.78 c	0.76 d	0.28 d	0
C	0.75	0.00 d	0.00 d	0.00 e	0
AH	0	10.30 a	5.10 b	0.52 a	3900 a
AH	0.25	8.50 b	1.38 c	0.49 b	3800 a
AH	0.5	2.88 c	0.98 d	0.27 d	3513 a
AH	0.75	0.00 d	0.00 d	0.00 e	2825 b
BA	0	13.20 a	5.40 b	0.47 b	4000 a
BA	0.25	7.60 b	1.90 c	0.33 c	2898 b
BA	0.5	3.76 c	1.04 c	0.25 d	2615 b
BA	0.75	0.00 d	0.00 d	0.00 e	2778 b

Altura de plántula, longitud radicular, peso fresco de plántula.

UFC/mL: Unidades formadoras de colonias adheridas al sistema radicular.

Las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

13. Germinación *in vitro* a un tiempo de escarificación de 4 minutos

Al comparar los diferentes tratamientos evaluados (control sin inoculantes, *A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens*) a diferentes concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), los resultados indican que a una escarificación de 4 minutos los tratamientos *B. amyloliquefaciens*, control sin inoculante y *A. halopraeferens*, presentaron igualdad con $P < 0.05$. Se observó que al incrementar la salinidad el % de germinación fue reducido en todos los tratamientos (Figura 12).

13.1. Tasa de germinación a un tiempo de escarificación de 4 minutos

La tasa de germinación obtenida por el tratamiento control a una escarificación de 4 minutos con las salinidades evaluadas mostró que a 0 y 0.25 M de NaCl a los 5 días el tratamiento control presenta un valor superior al compararlo con los demás tratamientos salinos. Sin embargo, al séptimo día la tasa de germinación es favorecida a una salinidad de 0.25 M de NaCl (Figura 13).

Con respecto al tratamiento inoculado con *A. halopraeferens* expuesto a diferentes salinidades, en la (Figura 13). Se puede observar que a una salinidad de 0.5 M de NaCl, fue el que sobresalió numéricamente en comparación de las demás salinidades, sin embargo es importante notar que no hubo diferencia significativa con 0 y 0.25 M de NaCl.

Respecto al inoculante *B. amyloliquefaciens* en semilla de mezquite chileno y escarificada por 4 minutos y expuesta a las diferentes salinidades, se puede observar que aquellos a una salinidad de 0, 0.25 y 0.5 M de NaCl presentaron diferencia significativa en comparación con el tratamiento de 0.75 M de NaCl con la bacteria *B. amyloliquefaciens* (Figura 13). No obstante ello, el tratamiento *B. amyloliquefaciens* a 0 salinidad, numéricamente sobrepasa en tasa de germinación a los tratados de manera separada (*B. amyloliquefaciens* + 0; separada *B. amyloliquefaciens* + 0.25 y separada *B. amyloliquefaciens* + 0.5 M de NaCl).

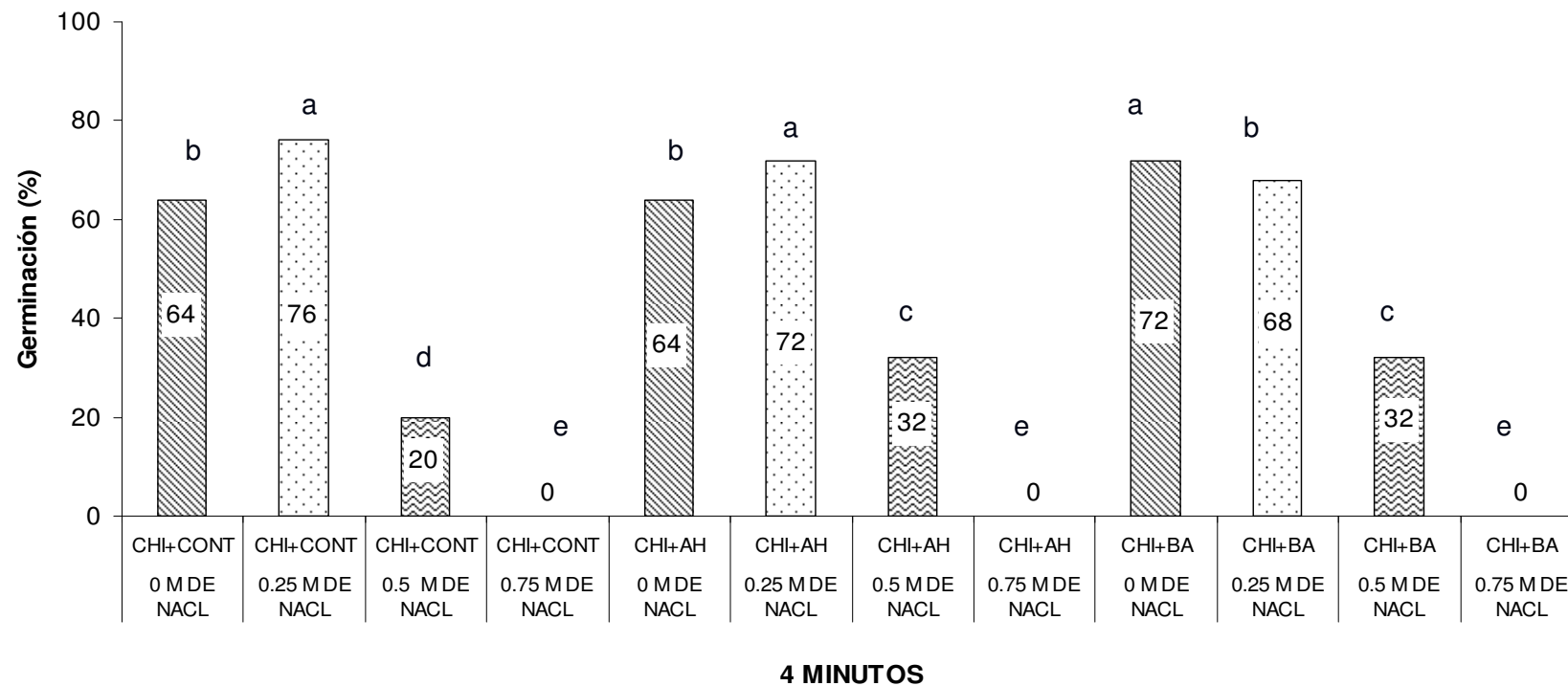


Figura 12. Porcentaje de germinación (%) de *Prosopis chilensis* con tiempo de escarificación de 4 minutos, (CHI= semilla de mezquite chileno, CONT=control, inoculantes AH= *Azospirillum halopraeferens*, BA= *Bacillus amyloliquefaciens*), bajo cuatro concentraciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M), las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

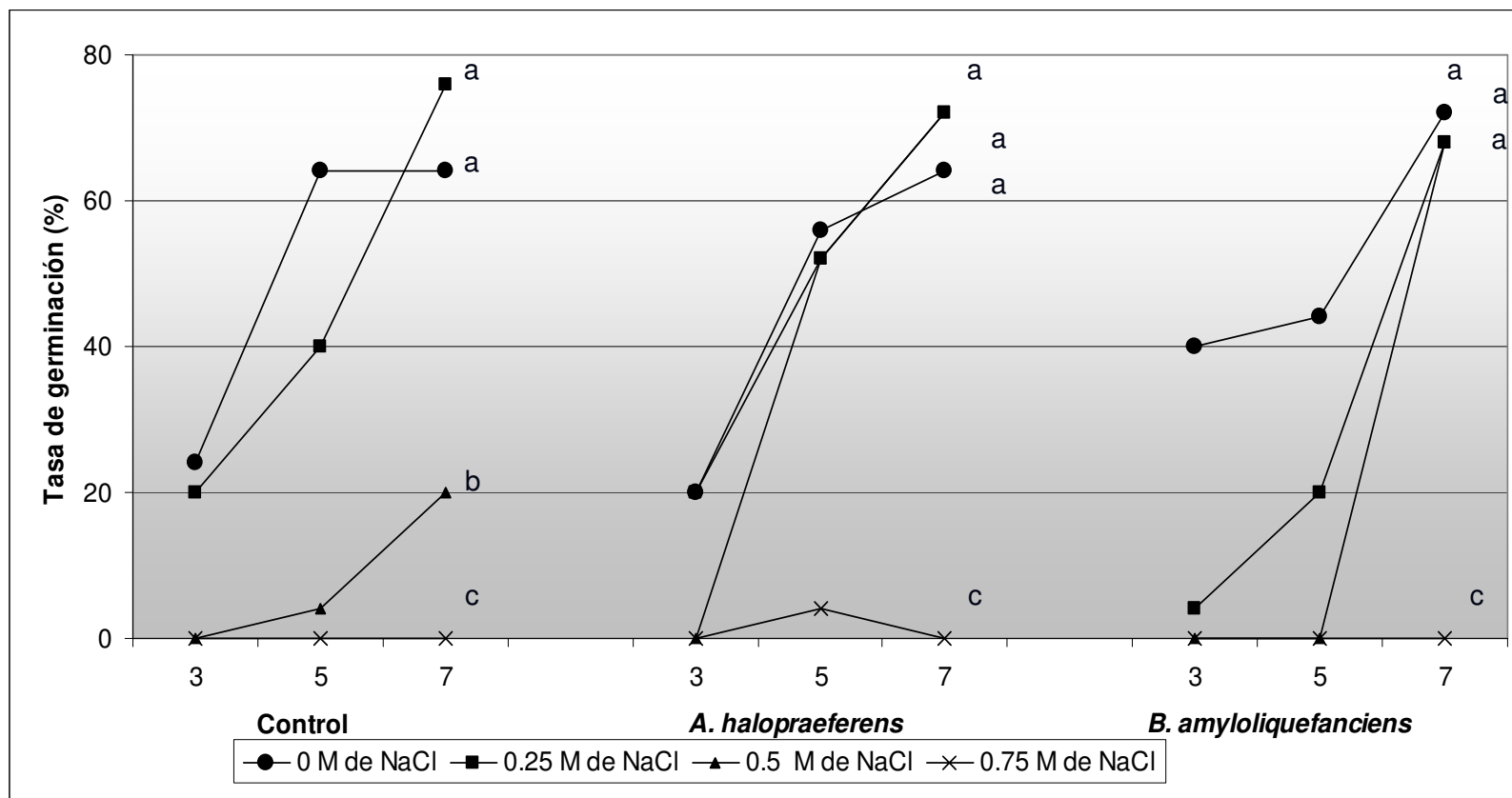


Figura 13. Efecto de la Tasa de germinación (%) de *Prosopis chilensis*, por *Azospirillum halopraeferens* y *Bacillus amyloliquefaciens*, con su respectivo control sin inoculante bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), a un tiempo de escarificación de cuatro minutos; las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

13.2. Longitud radicular y altura de plántula a un tiempo de escarificación de 4 minutos

Los resultados obtenidos a un tiempo de escarificación de 4 minutos con cuatro salinidades y las dos bacterias en estudio (*A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens*), en altura de plántula el tratamiento *B. amyloliquefaciens* a una salinidad de 0 M de NaCl, sobresalió significativamente en comparación con las demás tratamientos a las salinidades, quedando en segundo orden el tratamiento inoculado por *A. halopraeferens* a una concentración salina de 0 M de NaCl. En longitud de raíz, el Cuadro 10 muestra un similar comportamiento a una altura de plántula; se puede observar que el tratamiento con la bacteria *B. amyloliquefaciens* a una salinidad de 0 M de NaCl presentó diferencia significativa en comparación con los demás tratamientos; aquel tratamiento con el inoculante *A. halopraeferens* sujeto a 0 salinidad, mostró una igualdad significativa con el control sin inoculantes a 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl (Cuadro 10).

13.3. Peso fresco de plántula de mezquite chileno (*Prosopis chilensis*) a un tiempo de escarificación de 4 minutos

Los resultados obtenidos en los tratamientos de semilla de mezquite chileno con un tiempo de escarificación de 4 minutos, los resultados obtenidos se indican en el Cuadro 10, donde se puede observar que el inoculado con *B. amyloliquefaciens* a una salinidad de 0 M de NaCl, presentó diferencia significativa en comparación con los demás tratamientos y salinidades,

siguiéndole en segundo orden aque inoculado con *A. halopraeferens* a una salinidad de 0.25 M de NaCl. Los tratamientos control sin inoculantes se mostraron inferiores en comparación de los demás tratamientos (Cuadro 10).

13.4. Cuantificación de células bacterianas (Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) adheridas al sistema radicular de plantas de *P. chilensis* con un tiempo de escarificación de 4 minutos

Los resultados muestran que bajo cuatro minutos de escarificación de la semilla de mezquite chileno y diferente exposición salina, las dos bacterias en estudio se mostraron adheridas al sistema radicular de las plántulas. El Cuadro 10 muestra como a cero salinidad, el número de UFC/mL muestran igualdad con $P < 0.05$. Sin embargo conforme la salinidad se incrementa, se ve afectado el número de células bacterianas de *B. amyloliquefaciens* adheridas al sistema radicular en comparación de la bacteria *A. halopraeferens* (Cuadro 10).

Cuadro 10. Efecto de la inoculación de *Azospirillum halopraeferens*=AH y *Bacillus amyloliquefaciens*=BA, y su respectivo control=C sin inoculante en plántulas de *Prosopis chilensis*, bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), con un tiempo de escarificación de la semilla de *Prosopis chilensis* de cuatro minutos.

Inoculante	M NaCl	Altura de plántula (cm)	Longitud radicular (cm)	Peso fresco (mg)	UFC/mL
C	0	11.30 c	3.60 c	0.31 c	0
C	0.25	4.48 e	1.06 e	0.27 cd	0
C	0.5	2.76 g	0.76 f	0.19 d	0
C	0.75	0.00 h	0.00 h	0.00 e	0
AH	0	14.34 b	6.50 b	0.36 c	3817 a
AH	0.25	5.30 e	1.56 d	0.43 b	3392 b
AH	0.5	3.78 f	1.26 de	0.19 d	2333 c
AH	0.75	0.00 h	0.00 h	0.00 e	3420 b
BA	0	16.80 a	7.90 a	0.66 a	3900 a
BA	0.25	7.90 d	1.96 d	0.33 c	2467 c
BA	0.5	3.80 f	1.26 de	0.24 cd	2063 e
BA	0.75	0.00 h	0.00 h	0.00 e	2217 d

Altura de plántula, longitud radicular, peso fresco de plántula.

UFC/mL: Unidades formadoras de colonias adheridas al sistema radicular.

Las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

14. Germinación *in vitro* a un tiempo de escarificación de 6 minutos

Los resultados obtenidos en la germinación de *P. chilensis* en un tiempo de escarificación de 6 minutos, indican que a cero salinidad, se destacan significativamente los tratamientos control y el de *B. amyloliquefaciens*. Por su parte a 0.25 M de NaCl, sobresalen el inoculado con *A. halopraeferens* y el control. Se pudo observar que los tratamientos fueron afectados por la salinidad (Figura 14).

14.1. Tasa de germinación a un tiempo de escarificación de 6 minutos

La Figura 15 muestra como la tasa de germinación a un tiempo de escarificación de 6 minutos, y en las salinidades expuestas, a 0 y 0.25 M de NaCl no hubo diferencia significativa. Sin embargo, a 0.5 y 0.75 M la tasa de germinación fue afectada significativamente (Figura 15).

Respecto a los tratamientos inoculados con *A. halopraeferens*, la tasa de germinación en semilla escarificada por 6 minutos a 0.25 M de NaCl se ve favorecida significativamente en comparación del resto de los tratamientos. No obstante ello, es importante indicar que entre 0, 0.5 y 0.75 M de salinidad, sobresale aquel tratamiento ausente de NaCl (Figura 15).

Los resultados obtenidos a un tiempo de escarificación de 6 minutos con las concentraciones salinas y la bacteria *B. amyloliquefaciens* fue el siguiente: el tratamiento de 0 M de NaCl presentó diferencia significativa en comparación con los tratamientos de 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl con la bacteria *B. amyloliquefaciens* (Figura 15).

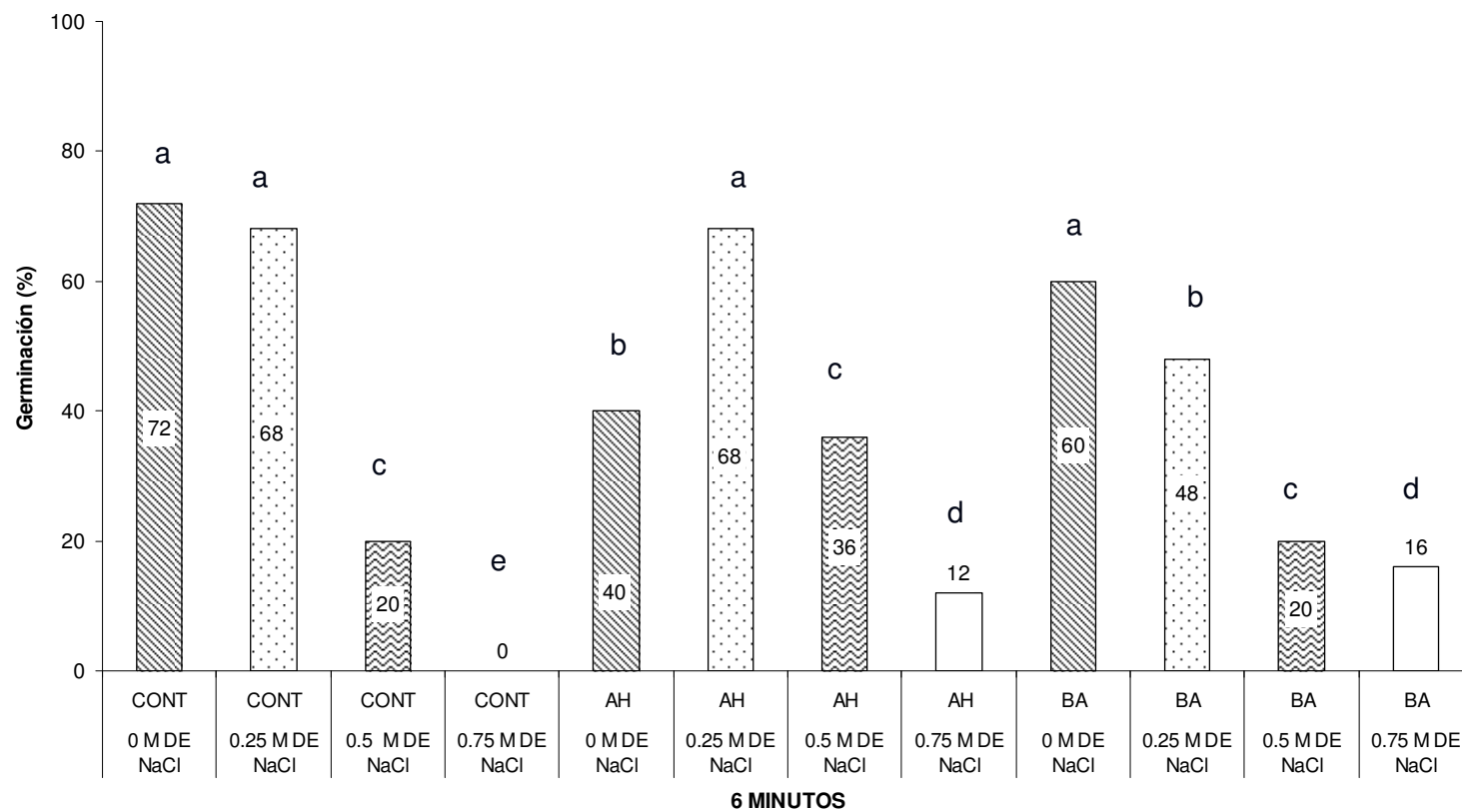


Figura 14. Porcentaje de germinación (%) de *Prosopis chilensis* con tiempo de escarificación de 6 minutos, (CONT=control, CHI= semilla de mezquite chileno, inoculantes AH= *Azospirillum halopraeferens*, BA= *Bacillus amyloliquefaciens*), bajo cuatro concentraciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M), las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

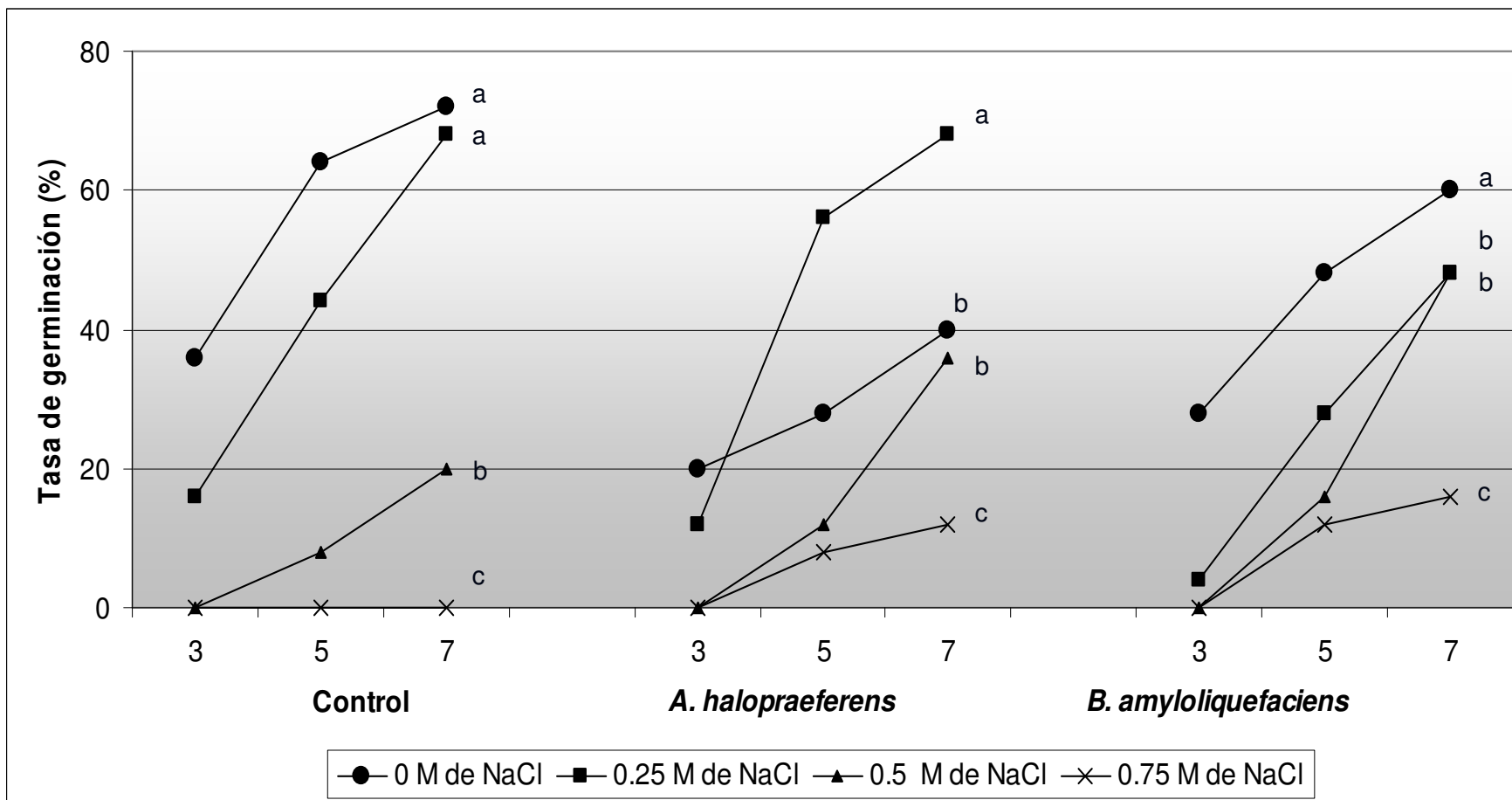


Figura 15. Efecto de la Tasa de germinación (%) de *Prosopis chilensis*, por *Azospirillum halopraeferens* y *Bacillus amyloliquefaciens*, con su respectivo control sin inoculante bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), a un tiempo de escarificación de seis minutos; las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

14.2. Longitud radicular y altura de plántula a un tiempo de escarificación de 6 minutos

Los resultados obtenidos en altura de plántula y longitud radicular, a un tiempo de escarificación de 6 minutos, la inoculación por separado de *A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens* bajo las diferentes concentraciones de salinidad (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), el tratamiento con la bacteria *A. halopraeferens* a una salinidad de 0 M de NaCl presentó diferencia significativa ($P < 0.05$) en comparación con las demás salinidades 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl. Se observó que el aumento de la salinidad afectó la altura. Acorde a la longitud de raíz, los tratamientos evaluados tuvieron un comportamiento similar entre ellos, destacando significativamente con $P < 0.05$ *A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens* y el control a una salinidad de 0 M de NaCl (Cuadro 11).

14.3. Peso fresco de plántula de mezquite chileno (*Prosopis chilensis*) a un tiempo de escarificación de 6 minutos

Sobre la variable peso fresco de plántula de mezquite chileno, los resultados indican que los efectos de las bacterias fijadoras de N_2 muestran los valores más altos con relación al control (no inoculado). Se observó que conforme aumenta la salinidad, el peso fresco es afectado (Cuadro 11).

14.4. Cuantificación de células bacterianas (Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) adheridas al sistema radicular de plantas de *P. chilensis* con un tiempo de escarificación de 6 minutos

Al contabilizar el número de células bacterianas adheridas a la raíz de mezquite chileno, se observó diferencias insignificativas entre las dos bacterias en estudio a 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl (Cuadro 11).

Cuadro 11. Efecto de la inoculación de *Azospirillum halopraeferens*=AH y *Bacillus amyloliquefaciens*=BA, y su respectivo control=C sin inoculante en plántulas de *Prosopis chilensis*, bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), con un tiempo de escarificación de la semilla de *Prosopis chilensis* de seis minutos.

Inoculante	M NaCl	Altura de plántula (cm)	Longitud radicular (cm)	Peso fresco (mg)	UFC/mL
C	0	6.70 c	8.40 a	0.49 b	0
C	0.25	4.00 c	1.50 b	0.27 c	0
C	0.5	2.88 d	0.96 c	0.21 c	0
C	0.75	0.00 f	0.00 d	0.00 e	0
AH	0	16.00 a	7.70 a	0.68 a	2920 b
AH	0.25	6.48 c	1.76 b	0.39 b	3533 a
AH	0.5	3.88 d	1.46 b	0.17 d	3429 a
AH	0.75	1.08 e	0.36 c	0.01 e	3467 a
BA	0	9.40 b	7.20 a	0.38 b	2333 b
BA	0.25	6.08 c	1.76 b	0.34 b	1558 c
BA	0.5	2.88 d	0.96 c	0.19 d	1727 c
BA	0.75	0.90 e	0.90 e	0.06 e	2353 b

Altura de plántula, longitud radicular, peso fresco de plántula.

UFC/mL: Unidades formadoras de colonias adheridas al sistema radicular.

Las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

15. Germinación *in vitro* a un tiempo de escarificación de 8 minutos

Se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el control sin inoculantes, las bacterias en estudio y entre las salinidades. Se observó que el control sobresale a 0 y 0.25 M de NaCl. Sin embargo conforme se incrementa la salinidad, los tratamientos inoculados superan al control sin inoculante. Cabe indicar que *A. halopraeferens* ligeramente es superior a *B. amyloliquefaciens* en las cuatro salinidades (Figura 16).

15.1. Tasa de germinación a un tiempo de escarificación de 8 minutos

Los resultados obtenidos en la tasa de germinación (Figura 17) sin considerar la inoculación de *A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens*, destacan aquellos que son expuestos a 0 y 0.25 M de NaCl.

Por su parte, los tratamientos donde se inoculó únicamente *A. halopraeferens*, los resultados obtenidos indican que a 0 M de NaCl, la tasa de germinación es favorecida de manera significativa con $P < 0.05$. En comparación con las demás salinidades (Figura 17).

Los resultados obtenidos en semilla escarificada durante 8 minutos e inoculada posteriormente con la bacteria *B. amyloliquefaciens*, se muestra que entre salinidades existió diferencia significativa, sobresaliendo la de 0 M de NaCl ($P < 0.05$). Los resultados indicaron que conforme la salinidad aumenta, el efecto en la tasa de germinación, se ve afectada negativamente (Figura 17).

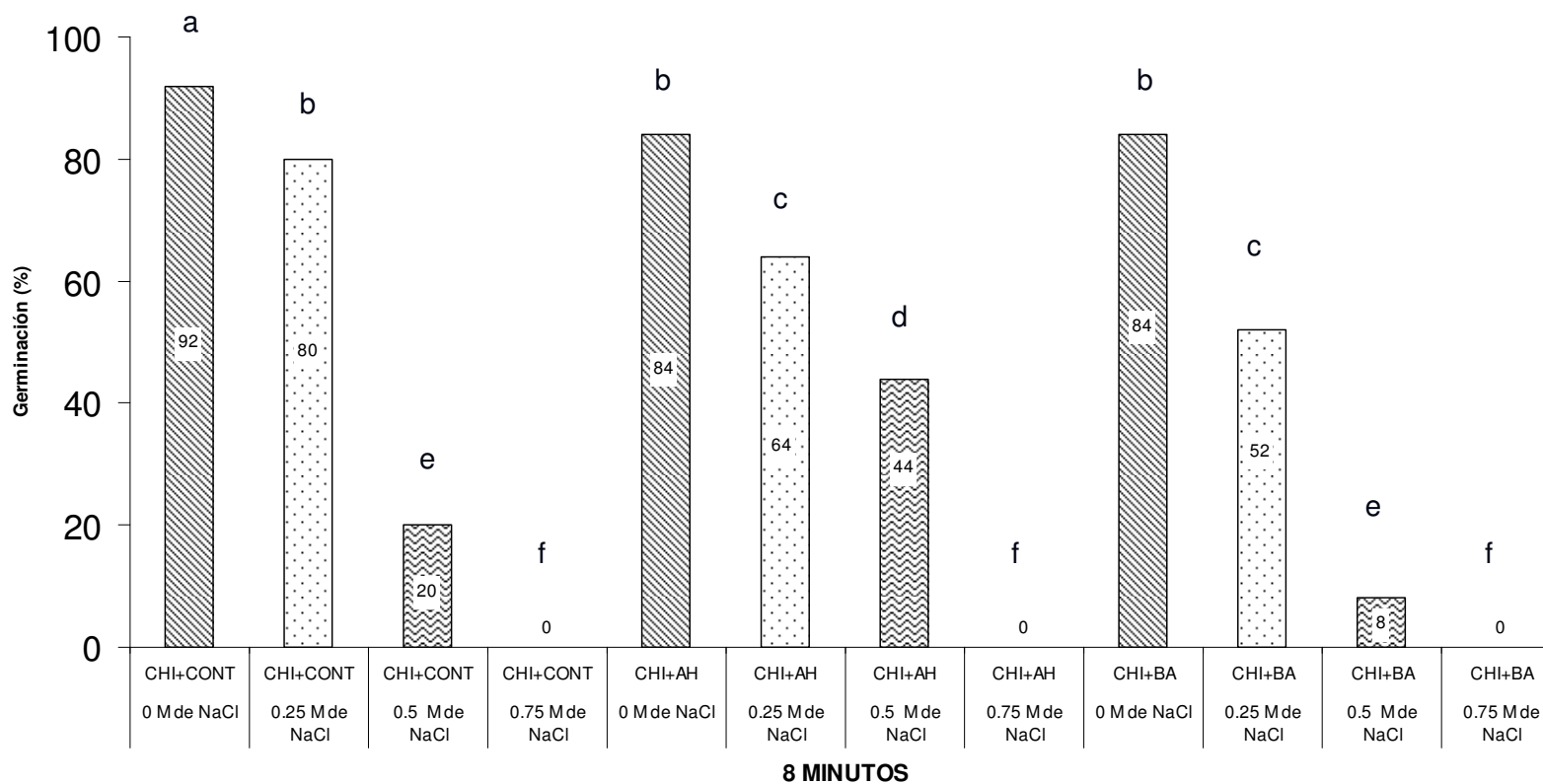


Figura 16. Porcentaje de germinación (%) de *Prosopis chilensis* con tiempo de escarificación de 8 minutos, (CONT=control, CHI= semilla de mezquite chileno, inoculantes AH= *Azospirillum halopraeferens*, BA= *Bacillus amyloliquefaciens*), bajo cuatro concentraciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M), las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

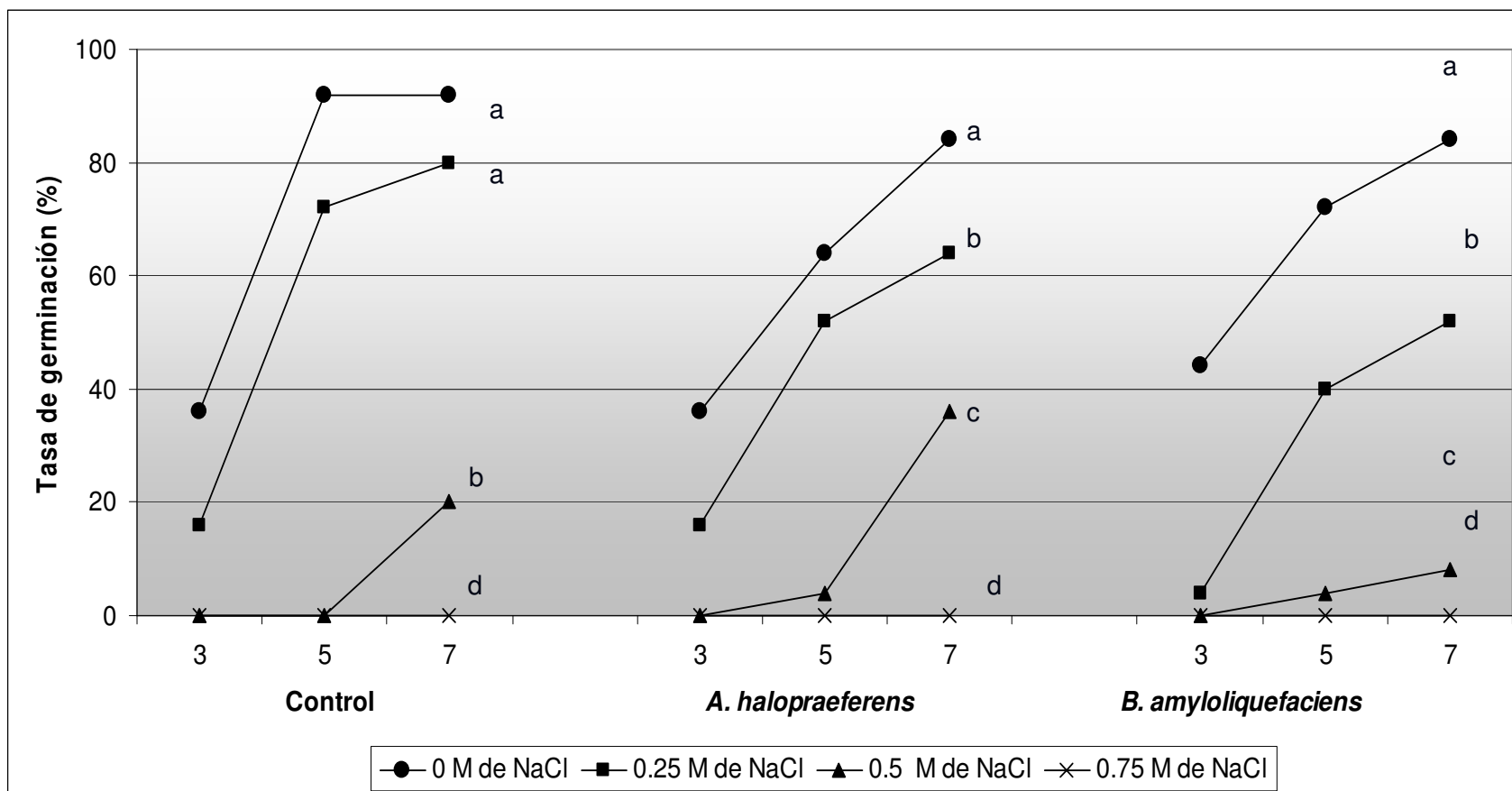


Figura 17. Efecto de la Tasa de germinación (%) de *Prosopis chilensis*, por *Azospirillum halopraeferens* y *Bacillus amyloliquefaciens*, con su respectivo control sin inoculante bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), a un tiempo de escarificación de ocho minutos, las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

15.2. Longitud radicular y altura de plántula a un tiempo de escarificación de 8 minutos

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$). En la Cuadro 12 se observa que la respuesta de la variable altura, fue similar al de la raíz, donde *A. halopraeferens* muestra los valores más altos seguida de *B. amyloliquefaciens*. Asimismo, se confirmó que esta variable disminuye conforme aumenta la salinidad.

15.3. Peso fresco de plántula de mezquite chileno (*Prosopis chilensis*) a un tiempo de escarificación de 8 minutos

El efecto de *A. halopraeferens* en el peso fresco a concentraciones de 0, 0.25 y 0.5 M de NaCl, mostró un efecto positivo con respecto a los demás tratamientos. Sin embargo, *B. amyloliquefaciens* fue mejor a salinidades de 0.25 y 0.5 M, en contraste con el control que mostró resultados opuestos (Cuadro 12).

15.4. Cuantificación de células bacterianas (Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) adheridas al sistema radicular de plantas de *P. chilensis* con un tiempo de escarificación de 8 minutos

Respecto al número de células adheridas al sistema radicular entre ambos inoculantes, en mezquite chileno y en cada una de las concentraciones salinas (Cuadro 12), se observó un ligero descenso con el aumento de NaCl por *Azospirillum* a 0.25 M, mientras que *Bacillus* lo mostró a 0.5 y 0.75 M de NaCl.

Cuadro 12. Efecto de la inoculación de *Azospirillum halopraeferens*=AH y *Bacillus amyloliquefaciens*=BA, y su respectivo control=C sin inoculante en plántulas de *Prosopis chilensis*, bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), con un tiempo de escarificación de la semilla de *Prosopis chilensis* de ocho minutos.

Inoculante	M NaCl	Altura de plántula (cm)	Longitud radicular (cm)	Peso fresco (mg)	UFC/mL
C	0	9.30 a	5.70 b	0.48 a	0
C	0.25	3.78 c	1.26 c	0.19 b	0
C	0.5	3.78 c	1.16 c	0.18 b	0
C	0.75	0.90 d	0.30 d	0.06 c	0
AH	0	10.50 a	8.10 a	0.40 a	3700 a
AH	0.25	6.98 b	1.96 c	0.40 a	3491 b
AH	0.5	3.78 c	1.26 c	0.19 b	3700 a
AH	0.75	0.00 e	0.00 e	0.00 c	3823 a
BA	0	10.50 a	4.60 b	0.42 a	3700 a
BA	0.25	6.70 b	2.00 c	0.46 a	3700 a
BA	0.5	3.78 c	1.26 c	0.18 b	604 d
BA	0.75	0.00 e	0.00 e	0.00 c	1130 c

Altura de plántula, longitud radicular, peso fresco de plántula.

UFC/mL: Unidades formadoras de colonias adheridas al sistema radicular.

Las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

16. Estudio en invernadero

16.1. Pruebas de emergencia a un tiempo de escarificación de 0 minutos

La emergencia de *P. chilensis* mostró un porcentaje significativo con $P < 0.05$, cuando fue expuesta a la inoculación de *A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens*. El efecto positivo fue favorecido a 0 y 0.25 M de NaCl en comparación al tratamiento control sin inoculantes (Figura 18).

16.2. Tasa de emergencia a un tiempo de escarificación de 0 minutos

Se encontraron diferencias significativas en la tasa de emergencia, cuando la semilla sin tratamiento de escarificación fue inoculada con *A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens*. Sin embargo, es importante notar que a 0.5 y 0.75 M de NaCl, los tratamientos inoculados no mostraron diferencia con $P < 0.05$ con respecto al control (Figura 19).

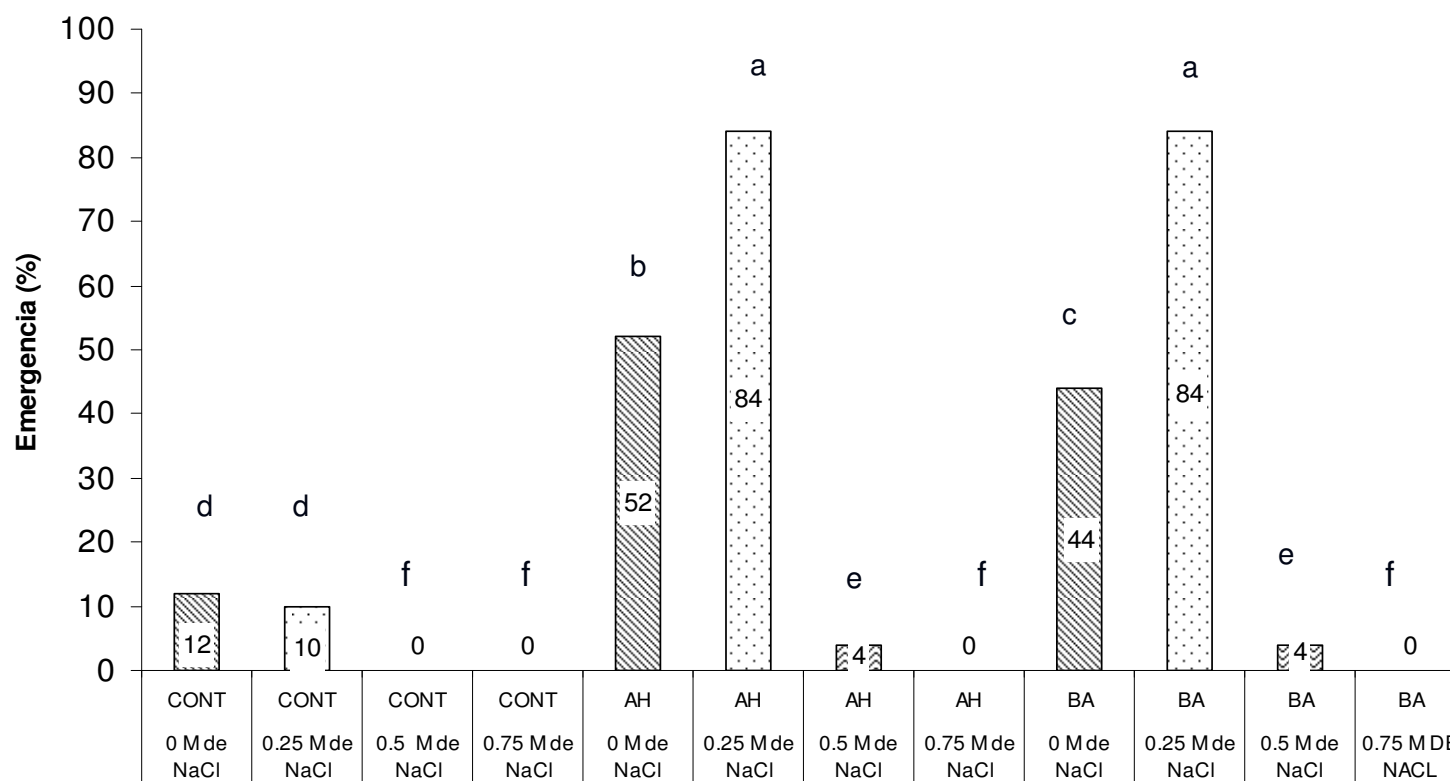


Figura 18. Efecto ejercido en el porcentaje de emergencia final (%) por *Azuspirillum halopraeferens*=AH y *Bacillus amyloliquefaciens*=BA, con su respectivo control=CONT sin inoculante, bajo condiciones de invernadero y con cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl). A un tiempo de escarificación de la semilla de *Prosopis chilensis* de cero minutos; literales muestran diferencia significativa ($P < 0.05$).

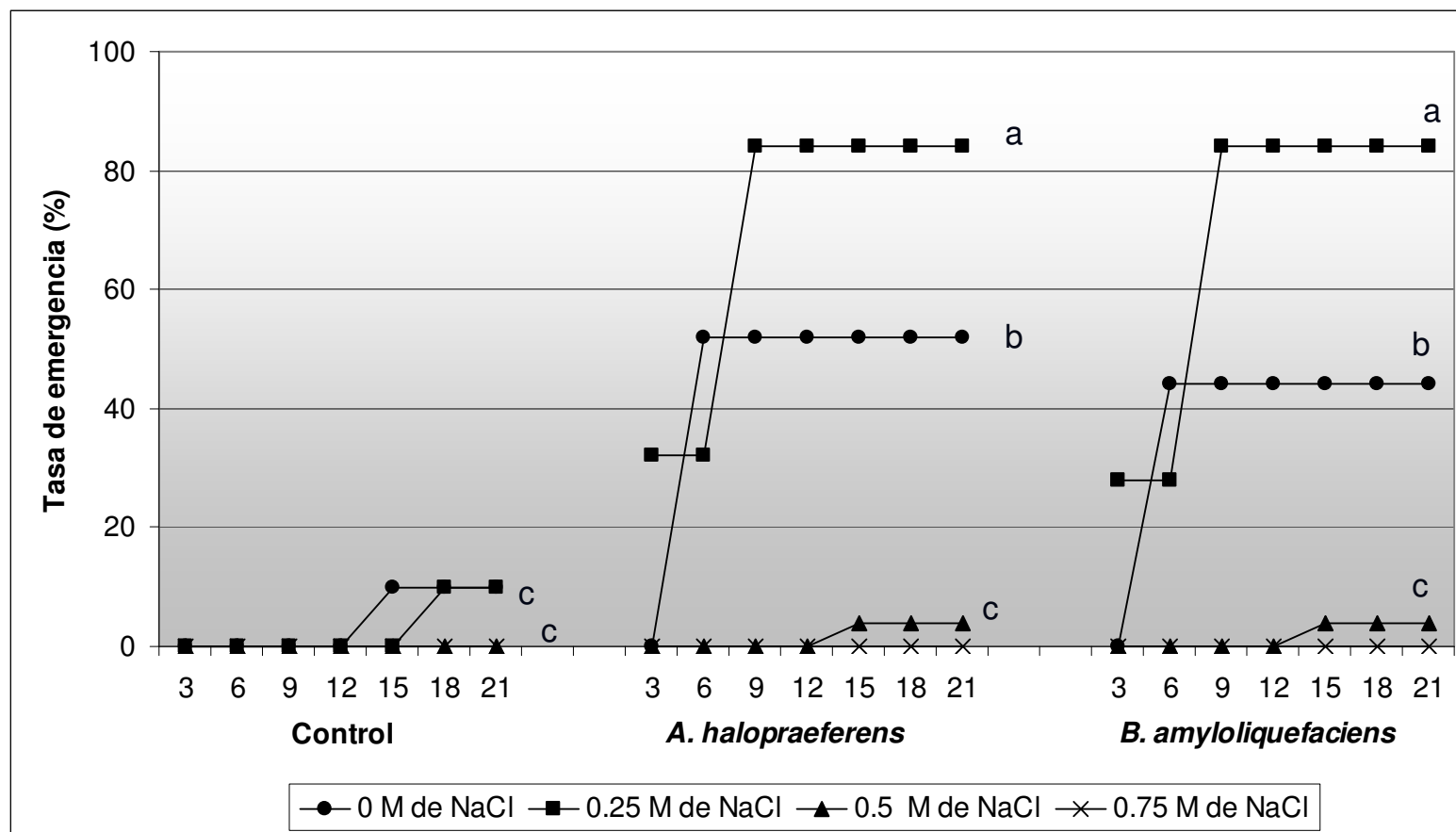


Figura 19. Efecto de la Tasa de emergencia (%) de *Prosopis chilensis*, por *Azospirillum halopraeferens* y *Bacillus amyloliquefaciens*, con su respectivo control sin inoculante bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), a un tiempo de escarificación de cero minutos; las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

16.3. Altura de planta, longitud radicular, peso fresco de planta, peso seco de planta, peso fresco y seco de raíz; unidades formadoras de colonias (UFC/mL) a un tiempo de escarificación de 0 minutos

Los resultados obtenidos a un tiempo de escarificación de cero minutos en altura de planta, longitud radicular y peso fresco, sobresalieron los tratamientos inoculados con las dos bacterias en estudio (*A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens*) en comparación con el control (Cuadro 13). De igual forma en el Cuadro 13, se pueden observar que el peso seco de planta y en peso fresco y seco de raíz se observan valores donde los tres tratamientos (control; *A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens*), bajo dos condiciones de salinidad (0 y 0.25 M de NaCl), no hubo diferencia significativa con $P < 0.05$. Sin embargo, a 0.5 M, sobresale significativamente *B. amyloliquefaciens* en comparación del resto de los tratamientos. Respecto a las UFC/mL no fueron afectadas por las salinidades (0, 0.25, 0.5 M de NaCl) como lo fue en 0.75 M para ambos inoculantes (Cuadro 13).

Cuadro 13. Efecto de la inoculación de *Azospirillum halopraeferens*=AH y *Bacillus amyloliquefaciens*=BA, y su respectivo control=C sin inoculante en plántulas de *Prosopis chilensis*, bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), con un tiempo de escarificación de la semilla de *Prosopis chilensis* de cero minutos.

Inoculante	M NaCl	Altura de planta (cm)	Longitud radicular (cm)	Peso fresco planta (mg)	Peso seco planta (mg)	Peso fresco de raíz	Peso seco de raíz	UFC/mL
C	0	1.12 b	1.79 c	0.09 c	0.02 b	0.06 b	0.01 a	0
C	0.25	0.89 b	1.51 c	0.23 a	0.05 a	0.15 a	0.02 a	0
C	0.5	0.00 c	0.00 e	0.00 d	0.00 c	0.00 d	0.00 b	0
C	0.75	0.00 c	0.00 e	0.00 d	0.00 c	0.00 d	0.00 b	0
AH	0	2.84 a	3.62 a	0.19 b	0.04 a	0.12 a	0.02 a	3,700 a
AH	0.25	2.35 a	2.93 b	0.21 a	0.04 a	0.14 a	0.02 a	3,300 b
AH	0.5	0.29 b	0.57 d	0.04 c	0.01 b	0.03 b	0.00 b	3,000 b
AH	0.75	0.00 c	0.00 e	0.00 d	0.00 c	0.00 d	0.00 b	2,067 c
BA	0	2.90 a	3.44 a	0.19 b	0.04 a	0.13 a	0.02 a	3,700 a
BA	0.25	2.19 a	2.83 b	0.18 b	0.04 a	0.12 a	0.02 a	3,467 b
BA	0.5	0.39 b	0.57 d	0.08 c	0.02 b	0.05 b	0.01 a	2,800 c
BA	0.75	0.00 c	0.00 e	0.00 d	0.00 c	0.00 d	0.00 b	2,512 c

Altura de planta, longitud radicular, peso fresco de planta, peso seco de planta, peso fresco y seco de raíz.

UFC/mL: Unidades formadoras de colonias adheridas al sistema radicular.

Las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

17. Prueba de emergencia a un tiempo de escarificación de 2 minutos

Al evaluar el porcentaje de emergencia en semilla de mezquite chileno por efecto de *A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens* en semilla escarificada por dos minutos, los resultados indican que a una salinidad de 0 y 0.25 M de NaCl, la inoculación favoreció significativamente con $P < 0.05$ en comparación del tratamiento control (Figura 20). Se pudo observar que la salinidad (0.5 y 0.75 M de NaCl) afecta el porcentaje de germinación en los tratamientos evaluados.

17.1. Tasa de emergencia a un tiempo de escarificación de 2 minutos

Los resultados obtenidos para la tasa de germinación, indican que a un tiempo de escarificación de dos minutos de la semilla de *P. chilensis*, los tratamientos con las dos bacterias (*Azospirillum halopraeferens* y *Bacillus amyloliquefaciens*), sobresalieron a una salinidad de 0, 0.25 y 0.5 M de NaCl, en comparación con el control (Figura 21).

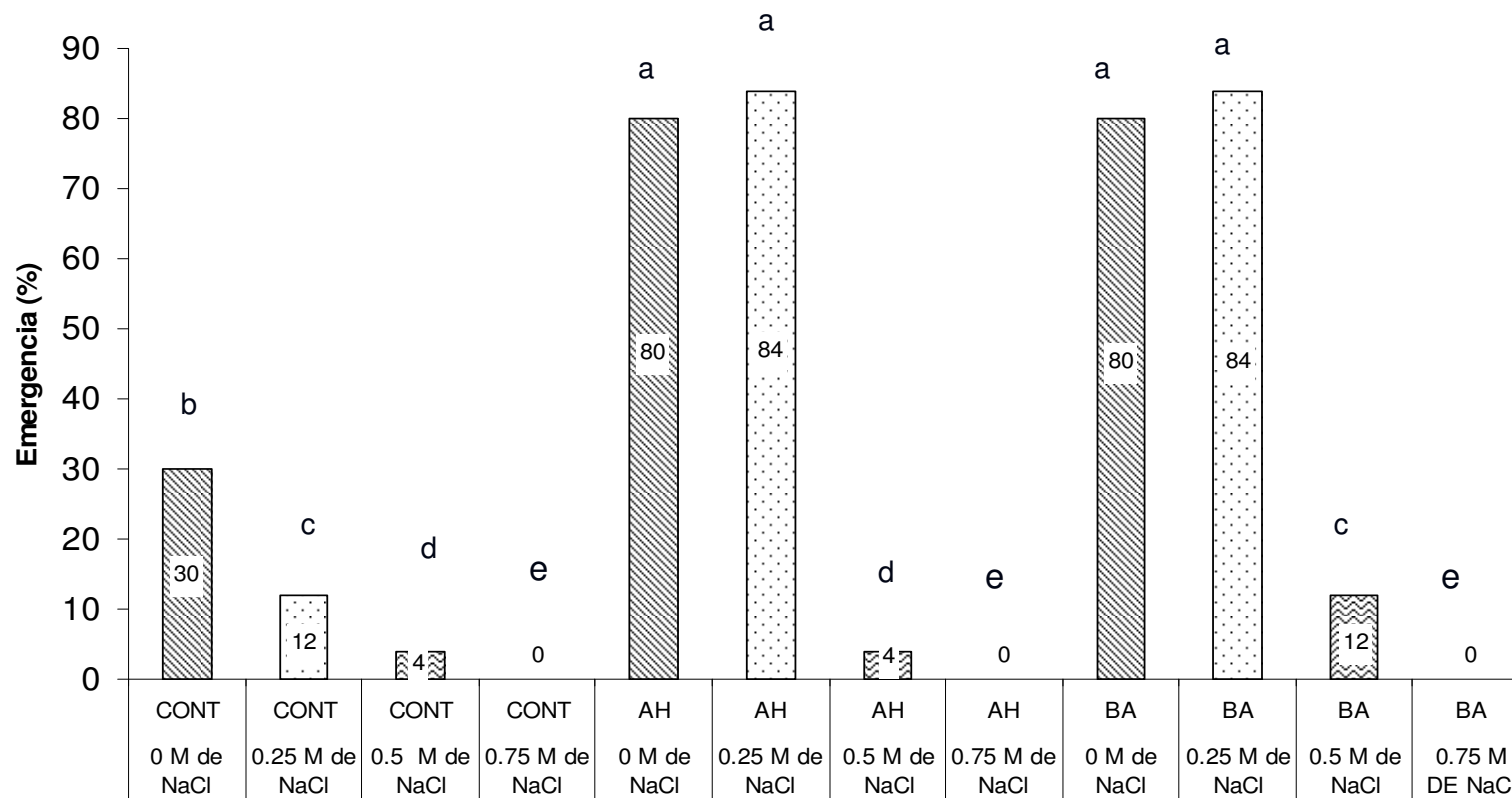


Figura 20. Efecto ejercido en el porcentaje de emergencia final (%) por *Azospirillum halopraeferens*=AH y *Bacillus amyloliquefaciens*=BA, con su respectivo control=CONT sin inoculante, bajo condiciones de invernadero y con cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl). A un tiempo de escarificación de la semilla de *Prosopis chilensis* de dos minutos, literales muestran diferencia significativa ($P < 0.05$).

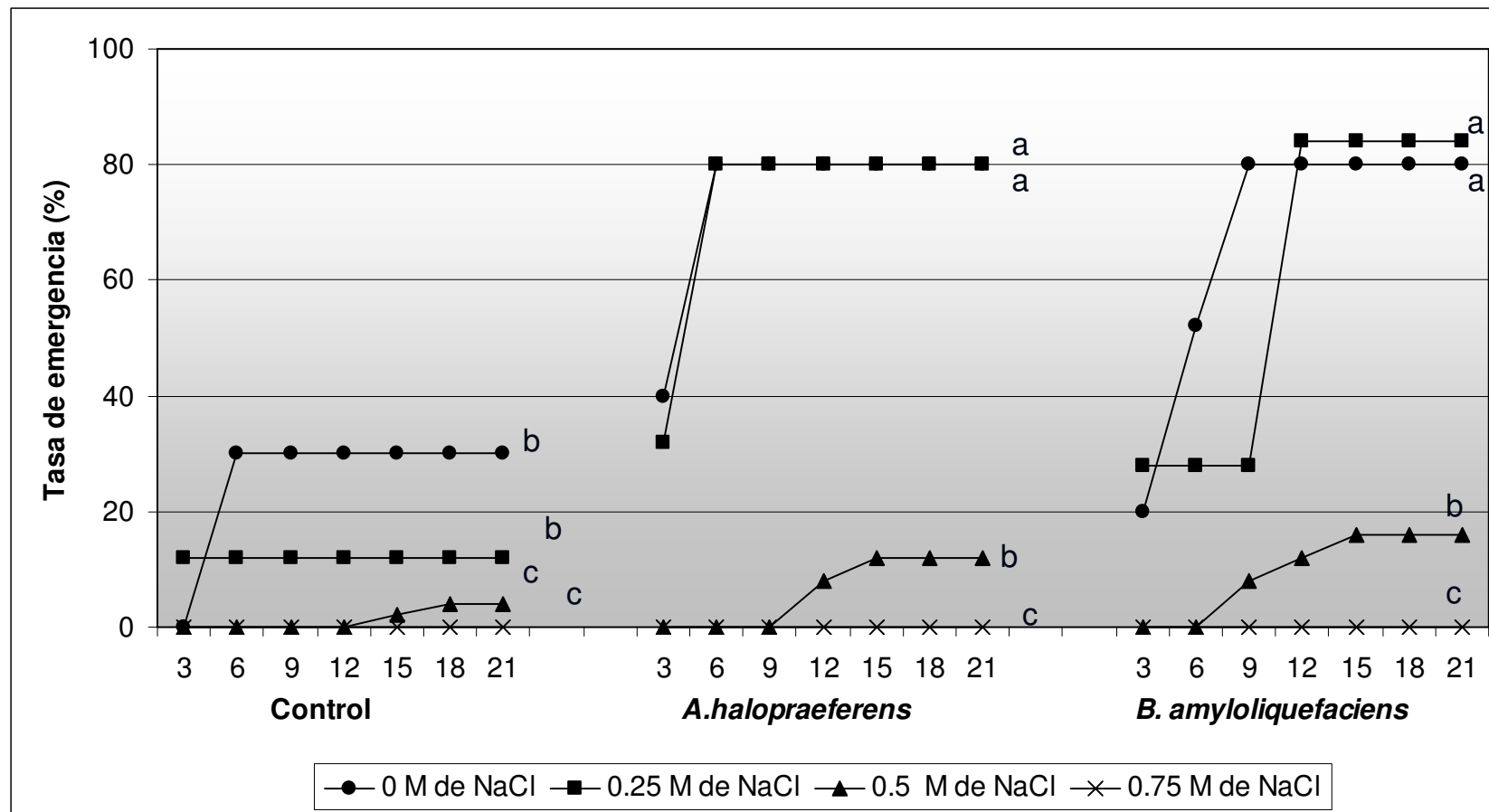


Figura 21. Efecto de la Tasa de germinación (%) de *Prosopis chilensis*, por *Azospirillum halopraeferens* y *Bacillus amyloliquefaciens*, con su respectivo control sin inoculante bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), a un tiempo de escarificación de dos minutos, las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

17.2. Altura de planta, longitud radicular, peso fresco de planta, peso seco de planta, peso fresco y seco de raíz; unidades formadoras de colonias (UFC/mL) a un tiempo de escarificación de 2 minutos

En altura de planta de *P. chilensis*, los resultados indican que los tratamientos con las dos bacterias *A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens* mostraron valores significativos a 0 M de NaCl en comparación del control; en longitud radicular y peso fresco de planta los dos tratamientos inoculados y el control mostraron igualdad con $P < 0.05$; un similar comportamiento fue observado en peso seco de planta, peso fresco de raíz y peso seco de raíz por los tres tratamientos evaluados con excepción de que a 0.25 M de NaCl, sobresalieron aquellos inoculados en comparación con el control (Cuadro 14).

Cuadro 14. Efecto de la inoculación de *Azospirillum halopraeferens*=AH y *Bacillus amyloliquefaciens*=BA, y su respectivo control=C sin inoculante en plántulas de *Prosopis chilensis*, bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), con un tiempo de escarificación de la semilla de *Prosopis chilensis* de dos minutos.

Inoculante	M NaCl	Altura de planta (cm)	Longitud radicular (cm)	Peso fresco planta (mg)	Peso seco planta (mg)	Peso fresco de raíz	Peso seco de raíz	UFC/mL
C	0	3.66 b	4.29 a	0.21 a	0.04 a	0.13 a	0.02 a	0
C	0.25	1.76 c	1.94 c	0.11 b	0.02 b	0.07 b	0.01 a	0
C	0.5	0.35 c	0.45 c	0.04 b	0.01 b	0.02 b	0.00 b	0
C	0.75	0.00 d	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 b	0
AH	0	4.61 a	4.48 a	0.22 a	0.04 a	0.14 a	0.02 a	3,900 a
AH	0.25	4.09 a	3.79 b	0.25 a	0.05 a	0.16 a	0.02 a	3,800a
AH	0.5	1.10 c	1.29 c	0.07 b	0.01 b	0.04 b	0.01 a	3,513 a
AH	0.75	0.00 d	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 b	2,825 b
BA	0	4.64 a	4.30 a	0.23 a	0.05 a	0.15 a	0.02 a	4,000 a
BA	0.25	3.93 b	3.69 b	0.22 a	0.04 a	0.14 a	0.02a	2,898 b
BA	0.5	1.49 c	1.39 c	0.09 b	0.02 b	0.06 b	0.01 a	2,615 b
BA	0.75	0.00 d	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 b	2,778 b

Altura de planta, longitud radicular, peso fresco de planta, peso seco de planta, peso fresco y seco de raíz.

UFC/mL: Unidades formadoras de colonias adheridas al sistema radicular.

Las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

18. Pruebas de emergencia a un tiempo de escarificación de 4 minutos

Los resultados obtenidos en el porcentaje de emergencia indican un 100% en aquellos inoculados por *A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens* y sujetos a 0 M de NaCl. Sin embargo al incrementar la salinidad, los tratamientos inoculados y el control fueron afectados significativamente con $P < 0.05$ (Figura 22).

18.1. Tasa de emergencia a un tiempo de escarificación de 4 minutos

Se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$) entre las bacterias en estudio y entre las salinidades. Se observó que en la interacción, el tratamiento con *A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens* presentaron las tasas de emergencia mayores con respecto a los demás tratamientos a 0 y 0.25 M de NaCl. Sin embargo a 0.5 0.75 M, la tasa de germinación fue decrementada significativamente en los tres tratamientos evaluados (*A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens* y el control (Figura 23).

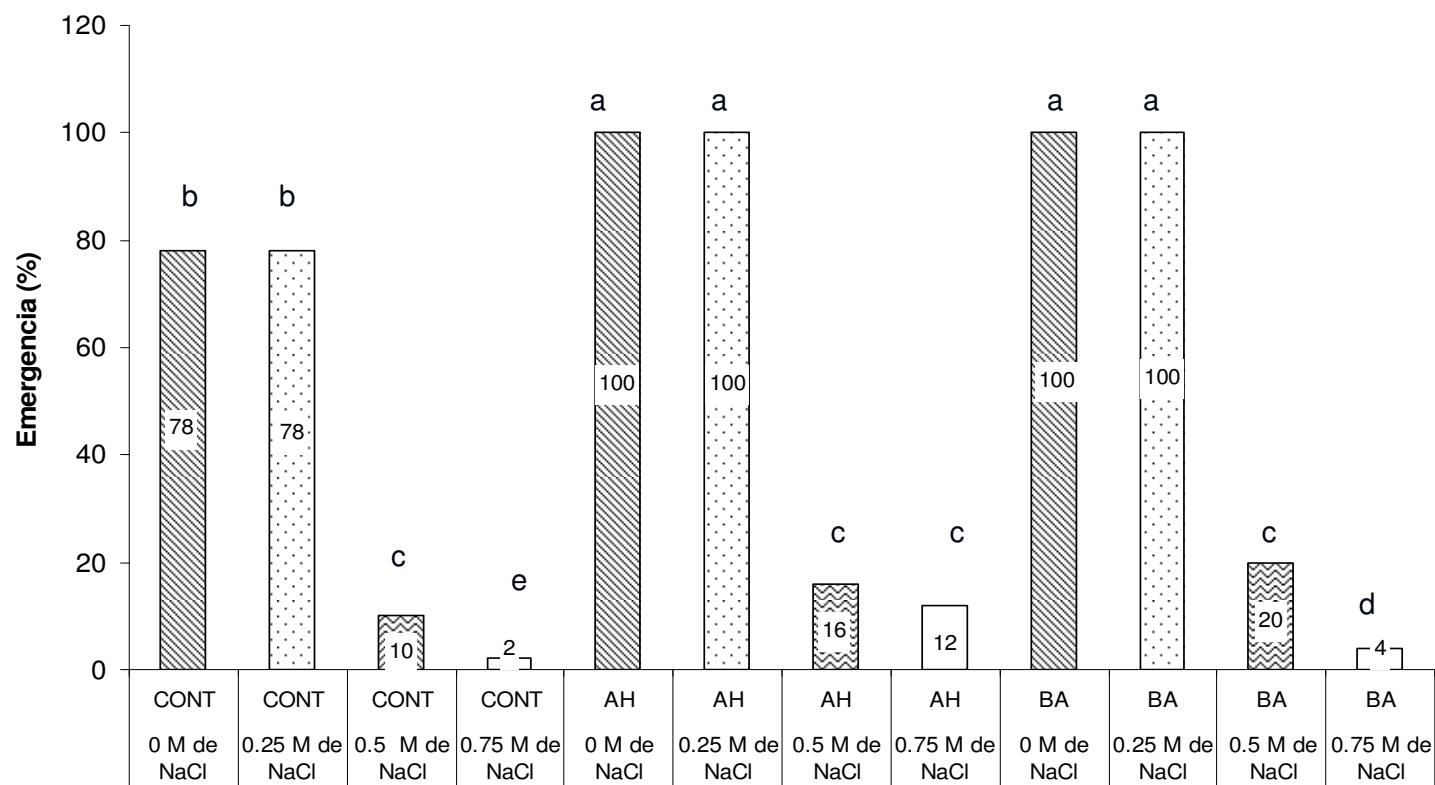


Figura 22. Efecto ejercido en el porcentaje de emergencia final (%) por *Azospirillum halopraeferens*=AH y *Bacillus amyloliquefaciens*=BA, con su respectivo control=CONT sin inoculante, bajo condiciones de invernadero y con cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl). A un tiempo de escarificación de la semilla de *Prosopis chilensis* de cuatro minutos, literales muestran diferencia significativa ($P < 0.05$).

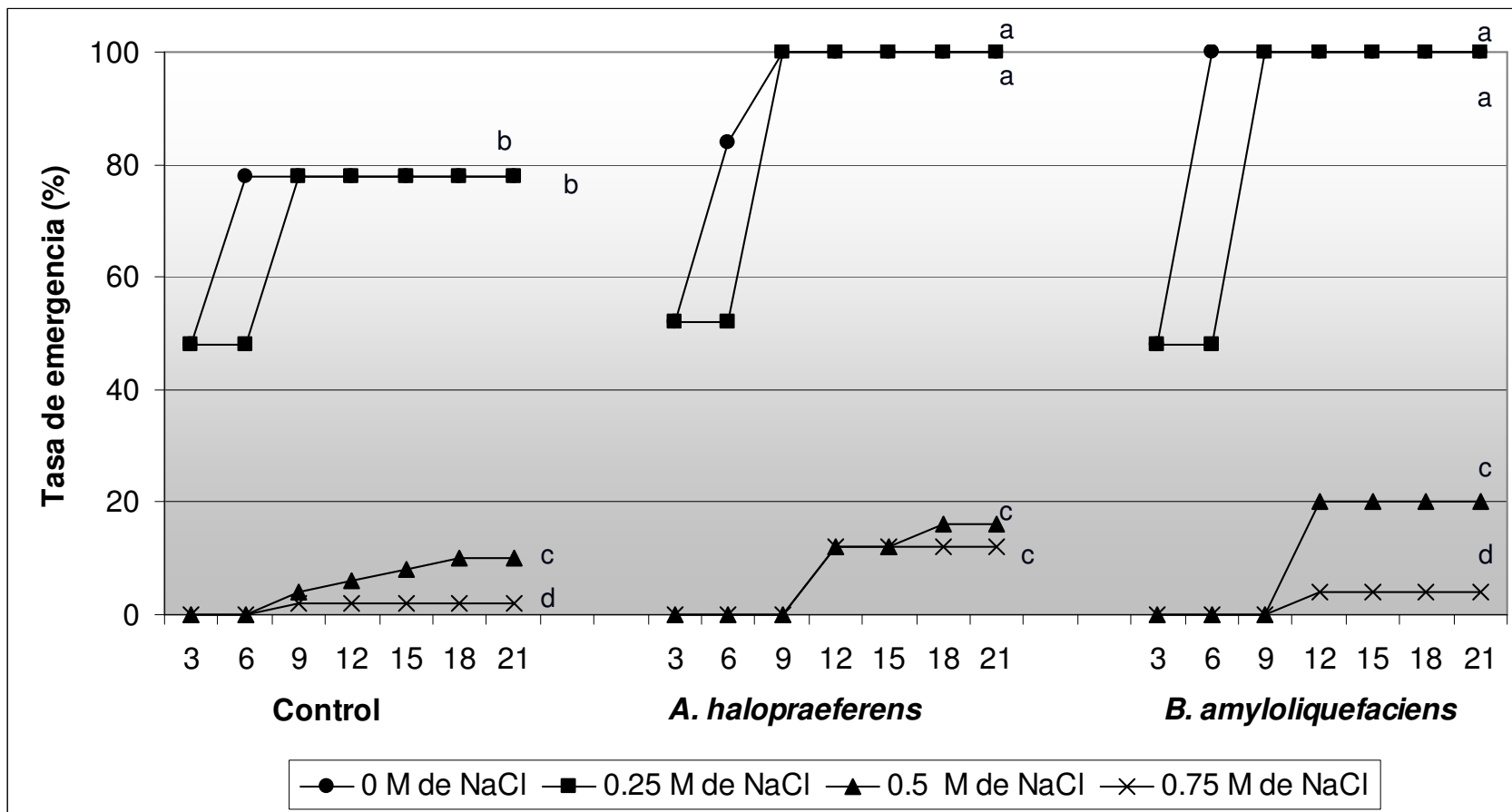


Figura 23. Efecto de la Tasa de germinación (%) de *Prosopis chilensis*, por *Azospirillum halopraeferens* y *Bacillus amyloliquefaciens*, con su respectivo control sin inoculante bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), a un tiempo de escarificación de cuatro minutos; las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

18.2. Altura de planta, longitud radicular, peso fresco de planta, peso seco de planta, peso fresco y seco de raíz; unidades formadoras de colonias (UFC/mL) a un tiempo de escarificación de 4 minutos

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$). En el Cuadro 15, se observa que la respuesta de la variable altura, los tratamientos con *A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens* sobresalieron en comparación con el control a 0 M de NaCl. Un similar comportamiento fue observado en esta misma variable a 0.25 M de NaCl donde únicamente sobresalió significativamente con $P < 0.05$. *B. amyloliquefaciens*. Se observó que la salinidad en todos los tratamientos afecta la altura de plántula. En longitud radicular, peso fresco y seco de plántula, peso seco y fresco de raíz, los resultados mostraron un similar comportamiento, mostrándose los tres tratamientos con un resultado significativo a una salinidad de 0 y 0.25 en comparación de 0.5 y 0.75 M de NaCl (Cuadro 15).

Cuadro 15. Efecto de la inoculación de *Azospirillum halopraeferens*=AH y *Bacillus amyloliquefaciens* =BA, y su respectivo control=C sin inoculante en plántulas de *Prosopis chilensis*, bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), con un tiempo de escarificación de la semilla de *Prosopis chilensis* de cuatro minutos.

Inoculante	M NaCl	Altura de planta (cm)	Longitud radicular (cm)	Peso fresco planta (mg)	Peso seco planta (mg)	Peso fresco de raíz	Peso seco de raíz	UFC/mL
C	0	4.88 b	5.38 a	0.30 a	0.06 a	0.20 a	0.03 a	0
C	0.25	4.26 b	4.36 b	0.33 a	0.07 a	0.21 a	0.03 a	0
C	0.5	1.28 c	1.35 d	0.07 c	0.01 bc	0.05 c	0.01 c	0
C	0.75	0.09 d	0.03 e	0.01 e	0.00 d	0.01 d	0.00 d	0
AH	0	6.00 a	5.57 a	0.32 a	0.06 a	0.21 a	0.03 a	3,817 a
AH	0.25	5.48 a	4.88 b	0.35 a	0.07 a	0.23 a	0.03 a	3,392 b
AH	0.5	2.30 c	1.82 d	0.17 b	0.03 b	0.11 b	0.02 b	2,333 c
AH	0.75	0.35 d	0.11 e	0.04 c	0.01 bc	0.03 c	0.00 d	3,420 b
BA	0	6.03 a	5.39 a	0.33 a	0.07 a	0.21 a	0.03 a	3,900 a
BA	0.25	5.32 a	4.78 b	0.32 a	0.06 a	0.20 a	0.03 a	2,467 c
BA	0.5	3.06 b	2.24 c	0.17 b	0.03 b	0.11 b	0.02 b	2,063 c
BA	0.75	0.20 d	0.05 e	0.02 d	0 d	0.01 c	0.00 d	2,217 c

Altura de planta, longitud radicular, peso fresco de planta, peso seco de planta, peso fresco y seco de raíz.

UFC/mL: Unidades formadoras de colonias adheridas al sistema radicular.

Literales muestran diferencia significativa ($P < 0.05$).

18.3. Análisis bromatológicos a un tiempo de escarificación de 4 minutos

Acorde a proteínas y lípidos, los análisis de varianza mostraron diferencias significativas en cuanto a su proporción. Se encontró que las plantas inoculadas con las bacterias fijadoras de N_2 , resultaron en un incremento de biomasa, reflejándose en valores superiores en comparación con plántulas de *P. chilensis* del tratamiento control (Cuadro 16).

Cuadro 16. Efecto de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Azospirillum halopraeferens* en contenidos totales de lípidos, proteínas y ceniza en plantas de *Prosopis chilensis* bajo cuatro concentraciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M).

Inoculante (Bacteria)	Salinidad M NaCl	Lípidos (mg)	Proteína (mg)	Ceniza (mg)
control	0	0.09 b	10.52 ab	0.82 bc
control	0.25	0.08 b	10.32 c	0.78 c
control	0.5	0.04 c	4.53 e	0.40 d
control	0.75	0.01 d	2.31 g	0.13 f
<i>A. halopraeferens</i>	0	0.11 a	10.55 ab	0.88 a
<i>A. halopraeferens</i>	0.25	0.11 a	10.54 ab	0.82 bc
<i>A. halopraeferens</i>	0.5	0.05 c	5.06 d	0.44 d
<i>A. halopraeferens</i>	0.75	0.02 d	2.43 g	0.19 e
<i>B. amyloliquefaciens</i>	0	0.12 a	10.68 a	0.88 a
<i>B. amyloliquefaciens</i>	0.25	0.11 a	10.55 ab	0.84 b
<i>B. amyloliquefaciens</i>	0.5	0.05 c	5.33 d	0.42 d
<i>B. amyloliquefaciens</i>	0.75	0.02 d	2.69 f	0.22 e

Las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

19. Pruebas de emergencia a un tiempo de escarificación de 6 minutos

Los resultados obtenidos en el porcentaje de emergencia indican que a una salinidad de 0, 0.25 los tratamientos inoculados con *A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens*, arrojaron altos valores significativos en comparación con el control ($P < 0.05$). Se observó que la salinidad a 0.5 y 0.75 M de NaCl, los tratamientos son afectados significativamente (Figura 24).

19.1. Tasa de emergencia a un tiempo de escarificación de 6 minutos

Se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$) entre las bacterias en estudio y el control, considerando las salinidades evaluadas. Se observó que en la interacción, los tratamientos con *A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens* a 0 y 0.25 M de NaCl sobresalen de aquellos a salinidades de 0.5 y 0.75 M de NaCl (Figura 25).

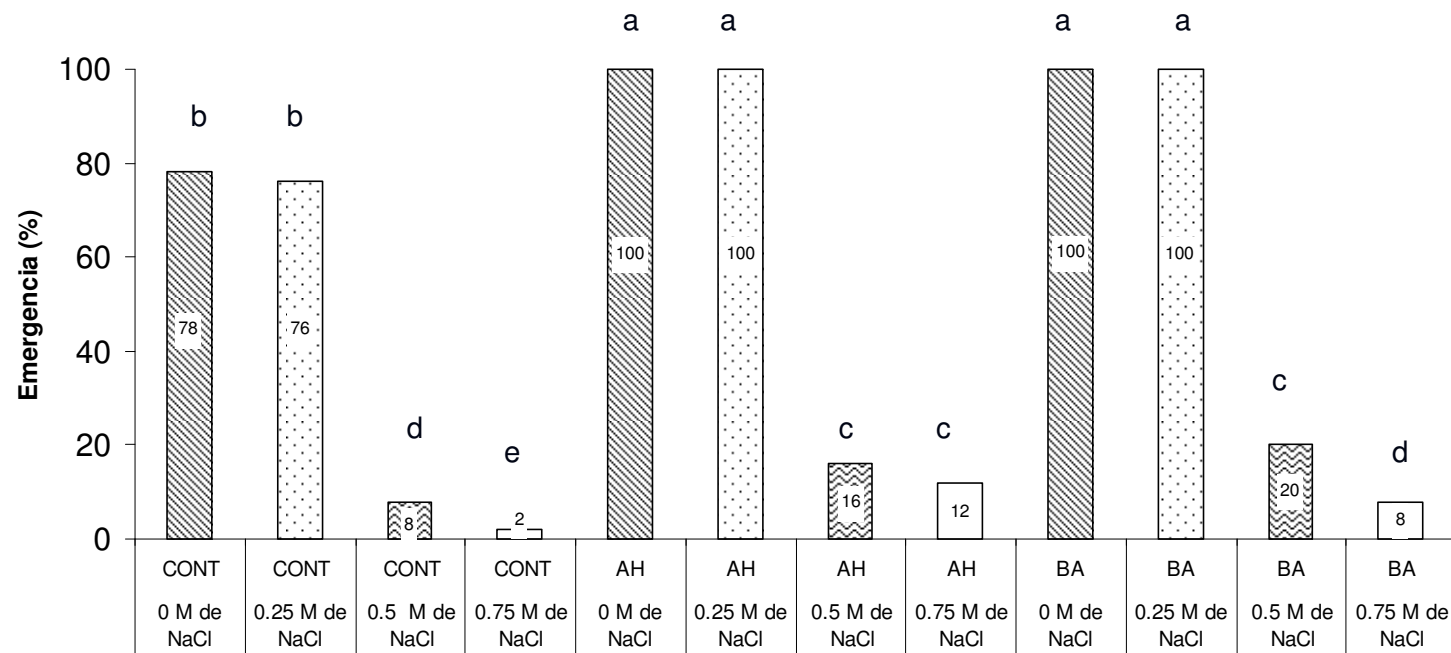


Figura 24. Efecto ejercido en el porcentaje de emergencia final (%) por *Azospirillum halopraeferens*=AH y *Bacillus amyloliquefaciens*=BA, con su respectivo control=CONT sin inoculante, bajo condiciones de invernadero y con cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl). A un tiempo de escarificación de la semilla de *Prosopis chilensis* de seis minutos; literales muestran diferencia significativa ($P < 0.05$).

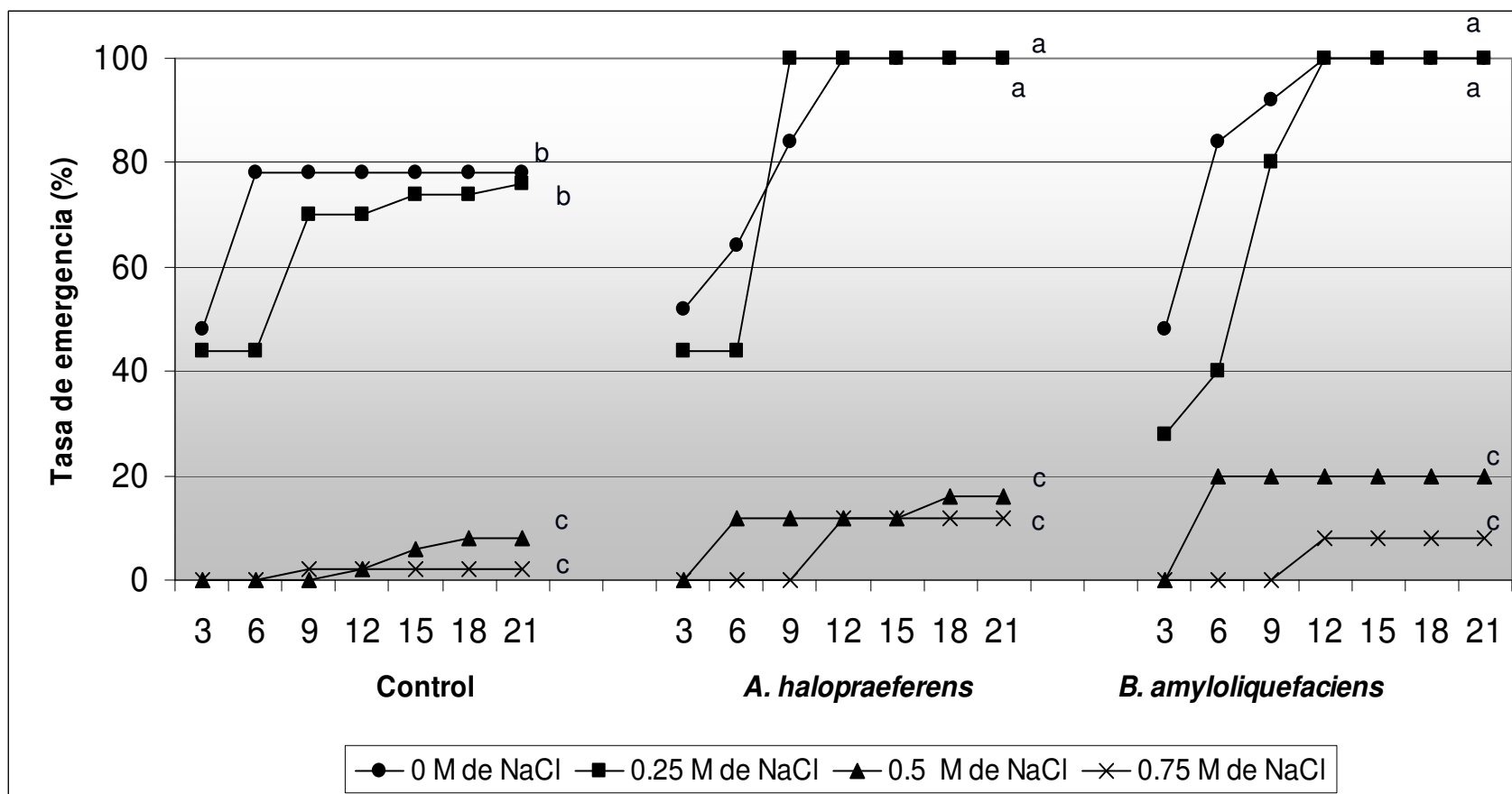


Figura 25. Efecto de la Tasa de germinación (%) de *Prosopis chilensis*, por *Azospirillum halopraeferens* y *Bacillus amyloliquefaciens*, con su respectivo control sin inoculante bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), a un tiempo de escarificación de seis minutos; las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

19.2. Altura de planta, longitud radicular, peso fresco de planta, peso seco de planta, peso fresco y seco de raíz; unidades formadoras de colonias (UFC/mL) a un tiempo de escarificación de 6 minutos

Los resultados de altura de planta presentaron valores superiores en el tratamiento con las dos bacterias *A. halopareferens* y *B. amyloliquefaciens*, en comparación con el control. En longitud radicular a una salinidad de 0 M de NaCl, en los tres tratamientos (control, *A. halopareferens* y *B. amyloliquefaciens*) presentaron valores similares. A una salinidad de 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl, sobresalieron los tratamientos con las dos bacterias *A. halopareferens* y *B. amyloliquefaciens*, en comparación con el control. En peso fresco y seco de planta, peso fresco y seco de raíz a una salinidad de 0 y 0.25 M de NaCl, los tres tratamientos se comportaron de manera similar (Cuadro 17).

Cuadro 17. Efecto de la inoculación de *Azospirillum halopraeferens*=AH y *Bacillus amyloliquefaciens* =BA, y su respectivo control=C sin inoculante en plántulas de *Prosopis chilensis*, bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), con un tiempo de escarificación de la semilla de *Prosopis chilensis* de seis minutos.

Inoculante	M NaCl	Altura de planta (cm)	Longitud radicular (cm)	Peso fresco planta (mg)	Peso seco planta (mg)	Peso fresco de raíz	Peso seco de raíz	UFC/mL
C	0	4.21 b	4.76 a	0.21 a	0.04 b	0.13 c	0.02 a	0
C	0.25	3.59 c	3.74 b	0.23 a	0.05 a	0.15 a	0.02 a	0
C	0.5	1.01 d	1.11 c	0.07 c	0.01 c	0.05 d	0.01 b	0
C	0.75	0.08 e	0.02 d	0.01 c	0.00 e	0.01 f	0.00 c	0
AH	0	5.33 a	4.95 a	0.22 a	0.04 b	0.14 b	0.02 a	3,817 a
AH	0.25	4.81 b	4.26 a	0.25 a	0.05 a	0.16 a	0.02 a	3,492 b
AH	0.5	1.90 d	1.45 b	0.11 b	0.02 c	0.07 d	0.01 b	3,333 b
AH	0.75	0.34 e	0.11 c	0.06 c	0.01 c	0.04 e	0.01 b	3,420 b
BA	0	5.36 a	4.77 a	0.23 a	0.05 a	0.15 a	0.02 a	3,900 a
BA	0.25	4.65 b	4.16 a	0.22 a	0.04 b	0.14 b	0.02 a	2,467 c
BA	0.5	2.66 c	1.87 b	0.13 b	0.03 c	0.08 d	0.01 b	2,063 c
BA	0.75	0.34 e	0.11 c	0.06 c	0.01 c	0.04 e	0.01 b	2,417 c

Altura de planta, longitud radicular, peso fresco de planta, peso seco de planta, peso fresco y seco de raíz.

UFC/mL: Unidades formadoras de colonias adheridas al sistema radicular.

Letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

20. Pruebas de emergencia a un tiempo de escarificación de 8 minutos

El resultado obtenido en el porcentaje de emergencia a un tiempo de escarificación de la semilla de *P. chilensis* de ocho minutos, a una salinidad de 0 M de NaCl, el tratamiento control a una salinidad de 0 M de NaCl presentó diferencia significativa en comparación con el tratamiento con las dos bacterias (*Azospirillum halopraeferens* y *Bacillus amyloliquefaciens*) a la misma salinidad (Figura 26).

20.1. Tasa de emergencia a un tiempo de escarificación de 8 minutos

El efecto de *A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens*, fue superado por el tratamiento control a una salinidad de 0 M de NaCl. Sin embargo conforme se incremento la salinidad a 0.25 M, la tasa de germinación fue superada por los tratamientos inoculados. Un comportamiento similar fue observado por los tres tratamientos a salinidades de 0.5 y 0.75 M de NaCl (Figura 27).

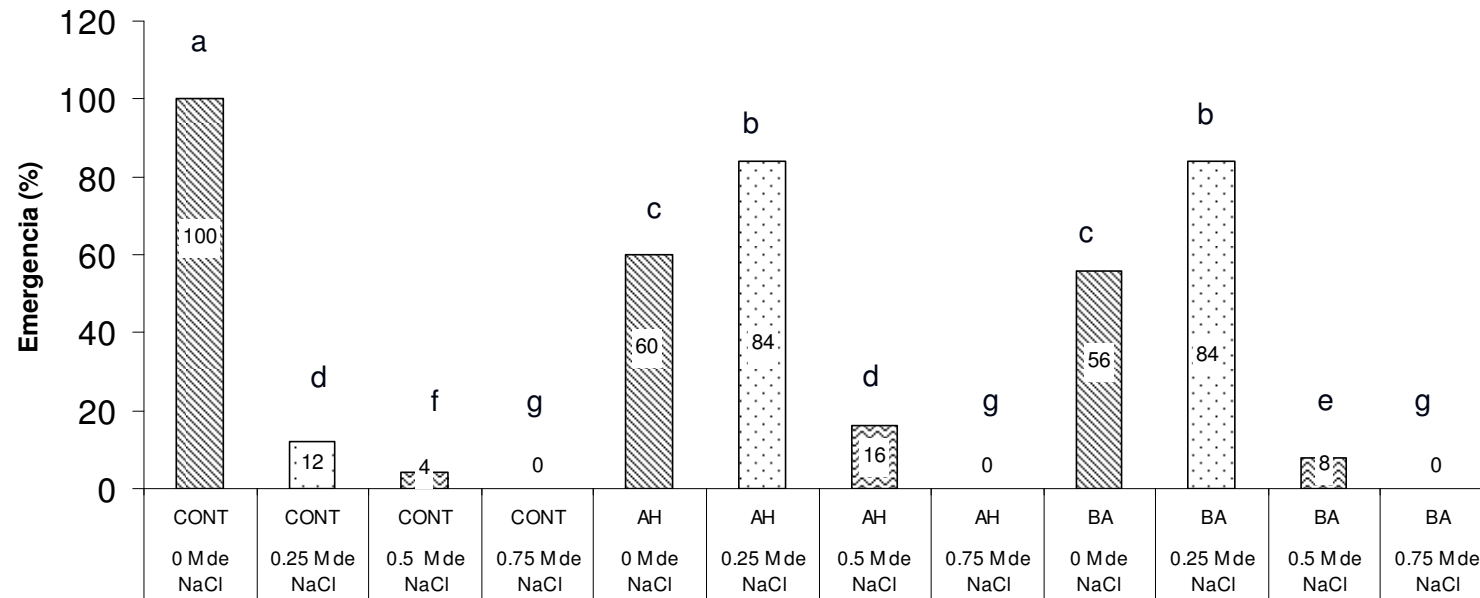


Figura 26. Efecto ejercido en el porcentaje de emergencia final (%) por *Azospirillum halopraeferens*=AH y *Bacillus amyloliquefaciens*=BA, con su respectivo control=CONT sin inoculante, bajo condiciones de invernadero y con cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl). A un tiempo de escarificación de la semilla de *Prosopis chilensis* de ocho minutos, literales muestran diferencia significativa ($P < 0.05$).

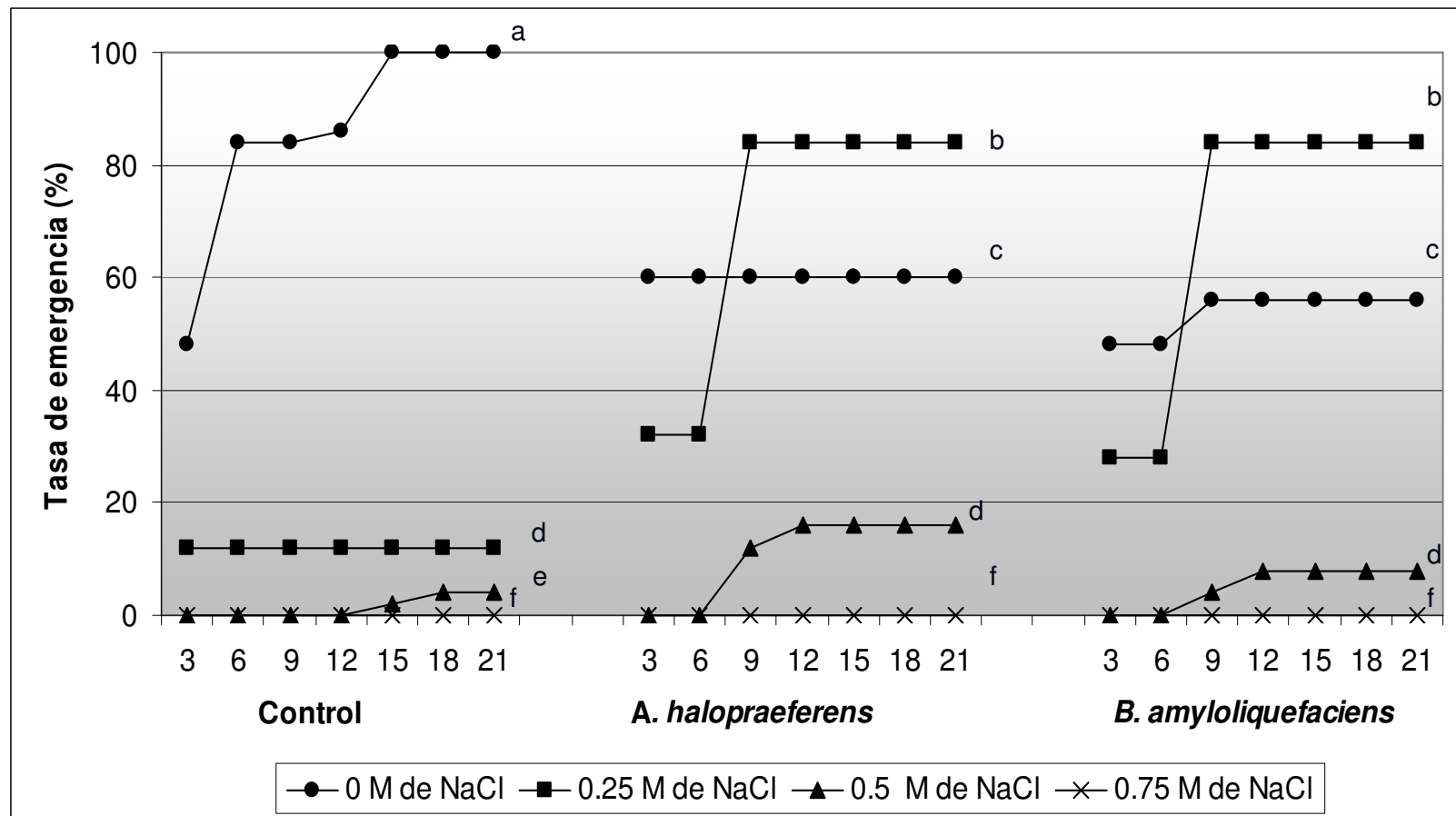


Figura 27. Efecto de la Tasa de germinación (%) de *Prosopis chilensis*, por *Azospirillum halopraeferens* y *Bacillus amyloliquefaciens*, con su respectivo control sin inoculante bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), a un tiempo de escarificación de ocho minutos, las letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

20.2. Altura de planta, longitud radicular, peso fresco de planta, peso seco de planta, peso fresco y seco de raíz; unidades formadoras de colonias (UFC/mL) a un tiempo de escarificación de 8 minutos

Los resultados obtenidos en altura de planta, longitud radicular, peso fresco de planta, sobresalieron los tratamientos con las dos bacterias en comparación con el control cuando son sujetos a 0 y 0.25 M de NaCl. En peso seco de planta, los valores altos son generados a una salinidad de 0.25 M de NaCl por los tratamientos inoculados, mientras que en peso fresco de raíz sobresalen los tratamientos *A. halopraeferens* de manera significativa con $P < 0.05$ a 0.25 M de NaCl (Cuadro 18).

Cuadro 18. Efecto de la inoculación de *Azospirillum halopraeferens*=AH y *Bacillus amyloliquefaciens* =BA, y su respectivo control=C sin inoculante en plántulas de *Prosopis chilensis*, bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), con un tiempo de escarificación de la semilla de *Prosopis chilensis* de ocho minutos.

Inoculante	M NaCl	Altura de planta (cm)	Longitud radicular (cm)	Peso fresco planta (mg)	Peso seco planta (mg)	Peso fresco de raíz	Peso seco de raíz	UFC/mL
C	0	2.04 b	3.89 b	0.16 b	0.03 b	0.10 c	0.02 a	0
C	0.25	0.73 d	1.55 c	0.10 c	0.02 c	0.07 d	0.01 b	0
C	0.5	0.06 e	0.37 e	0.03 c	0.01 d	0.02 f	0.00 c	0
C	0.75	0.00 f	0.00 f	0.00 d	0.00 e	0.00 g	0.00 c	0
AH	0	3.16 a	4.08 a	0.17 b	0.03 b	0.11 c	0.02 a	3,700 a
AH	0.25	2.64 b	3.39 b	0.20 a	0.04 a	0.13 a	0.02 a	3,491 b
AH	0.5	0.52 c	0.75 d	0.05 c	0.01 d	0.04 e	0.01 b	3,700 a
AH	0.75	0.00 f	0.00 f	0.00 d	0.00 e	0.00 g	0.00 c	3,823 a
BA	0	3.19 a	3.90 b	0.18 b	0.04 a	0.12 b	0.02 a	3,700 a
BA	0.25	2.48 b	3.29 b	0.17 b	0.03 b	0.11 c	0.02a	3,700 a
BA	0.5	0.93 c	0.95 d	0.07 c	0.01 d	0.04 e	0.01 b	604 d
BA	0.75	0.00 f	0.00 f	0.00 d	0.00 e	0.00 g	0.00 c	1,130 c

Altura de planta, longitud radicular, peso fresco de planta, peso seco de planta, peso fresco y seco de raíz.

UFC/mL: Unidades formadoras de colonias adheridas al sistema radicular.

Letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

21. DISCUSIÓN

Aislamiento de microorganismos fijadores de nitrógeno de rizósfera de *Prosopis glandulosa*

Debido a factores adversos (bióticos y abióticos) a los que están expuestas las plantas de ambientes áridos, las halófitas para fines de reforestación en áreas salinas son los recursos biológicos más promisorios (Lieth y Masoom, 1993). El género *Prosopis*, una halófito que se desarrolla en el desierto sonorense, se vislumbra para el futuro inmediato como una opción de reforestación. Aunado a lo anterior, los microorganismos con efecto benéfico en las plantas, juegan un papel potencial y considerable como agentes de biofertilizantes (Bidwell, 1979; Devlin, 1980; Arsac, 1990; Parke, 1991; Sacon, 1993). Sin embargo, las investigaciones referentes a bacterias promotoras de crecimiento y el género *Prosopis* son escasas (Reinhold et al., 1987; Hamdi, 1999; Ungar, 2000; Rojas et al., 2001), algunos estudios (Booth et al., 1988; Goodfriend et al., 2000; Hilderbrandt et al., 2000; Bagwell et al., 2001). Sobre este tipo de vegetales y el medio ambiente que les rodea con la finalidad de ampliar la gama de bacterias fijadoras de nitrógeno endémicas, conocimiento de la densidad de inóculo, fisiología de cepas promotoras, su inoculación en diferentes cultivos, ecología a nivel de rizósfera entre otros aspectos.

Debido a que en la presente investigación, se detectaron microorganismos fijadores de nitrógeno (19 aislados), el actual trabajo muestra y confirma que la asociación de bacterias benéficas asociadas a la rizósfera de la halófito *P. glandulosa* en el desierto Sonorense, lo cual es un aporte a la investigación sobre

la detección de bacterias promotoras de crecimiento vegetal con posible potencial agrícola, y donde es necesario conocer la influencia positiva sobre las plantas; ya que estudios previos concernientes a la reproducción de árboles (Mc Graw y Ungar 1981; Ungar, 2000), la productividad de este tipo de plantas está limitada a la disponibilidad de nitrógeno en biomasa, entre otros aspectos. Además de que una de las actividades agrícolas que se realizan para solucionar la deficiencia de nitrógeno es el uso de fertilizantes sintéticos, lo cual frecuentemente cae en un uso indiscriminado, afectando principalmente la microflora del suelo, entre ellos los microorganismos benéficos (Martínez, 1996).

De igual forma, los resultados indican que la obtención de bacterias fijadoras de nitrógeno mediante técnicas de cultivo libres de una fuente de nitrógeno a una concentración de 0.5 M de NaCl, resultó ser apropiada para determinar la presencia de este tipo de microorganismos, ya que se lograron obtener 19 aislamientos en los puntos de muestreo de *Prosopis glandulosa*. Lo anterior indica que las especies microbianas no pueden existir aisladas en la naturaleza, originando posibilidades de interacciones que pueden ser benéficas o perjudiciales, antagónicas o sinérgicas (Brock et al., 1987). El antagonismo estaría dado por el daño existente para uno o ambos organismos y el sinergismo por las interacciones entre bacterias que puedan efectuarse por medio del intercambio de nutrimentos, por la remoción de algunos productos inhibitorios o por medio de mecanismos físicos y químicos, tales como en la concentración de oxígeno o en el potencial óxido-reducción (Bashan y Holguin, 1997). Este último

aspecto reviste un marcado interés para utilizarlas como biofertilizantes ya sea de manera aislada o utilizadas en co-inoculación (Khammas y Kaiser, 1992).

Por otra parte, en el estudio de reducción de acetileno de los 19 aislamientos, la bacteria halotolerante *B. amyloliquefaciens*, fue la única que mostró una alta actividad comparada con el control halotolerante *Azospirillum halopraeferens*. Lo anterior es indicativo para inferir que en estudios de bacterias por separado, las mismas pueden disminuir su capacidad para reducir el acetileno. Dicha aseveración pudo deberse a que la ausencia de la interacción de estas bacterias fijadoras de N₂ con otros microorganismos diazotróficos, al parecer promueven o inhiben su actividad, lo cual es común entre microorganismos (Drodowicz y Ferreira, 1987; Will y Sylvia, 1990; Isopi et al., 1995; Halsall y Gibson, 1989; Holguin et al., 1992, Holguin y Bashan, 1996; Rönkkö et al., 1993; Rojas et al., 2001).

Los análisis de identificación y caracterización de la bacteria con alta actividad reductora de acetileno mostraron que se trata del género-especie *Bacillus amyloliquefaciens*, la cual se ha encontrado en forma natural en suelo y agua así como también asociada a plantas de manera endófito (Ladha et al., 1983; Das, 1991; Shloter y Hartmann, 1998; Chelius y Triplett, 2000). Sin embargo, en ambientes salinos, en especial para *P. glandulosa*, el presente estudio, es el primer reporte que se tiene de dicho microorganismo.

Prueba in vitro en germinación y en emergencia de P. chilensis en invernadero

Los resultados *in vitro* y de invernadero con las cuatro concentraciones salinas de 0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl arrojaron, que el porcentaje de germinación y de emergencia se redujo por el efecto de la salinidad, coincidiendo con numerosos estudios como los de Khan et al. (1976); Mc Graw y Ungar (1981); Felker et al. (1981); Philipupiya y Ungar (1984), excepto para aquellos inoculados con las bacterias del estudio a una molaridad de 0 a 0.25 M de NaCl. Se pudo observar que por arriba del 5% de NaCl (0.856 M), inducen a las semillas a un estado de latencia, aspecto que concuerda con Khan et al. (1976); Mc Graw y Ungar (1981); Felker et al. (1981); Philipupiya y Ungar (1984); Velarde et al. (2003); Meloni et al. (2004); Villagra y Cavagnaro (2005); Sosa et al. (2005). Sin embargo, dicho efecto (% emergencia) en condiciones de NaCl, se vio mitigado por la inoculación de las bacterias (0 y 0.25 M), las cuales favorecen diversos procesos fisiológicos de las plantas debido a la producción de hormonas, capaces de influir en la velocidad del metabolismo, así como en la respiración de la semilla y posterior desarrollo de la raíz hospedada según Kozyrovskaya et al. (1990); Haahtela et al. (1990); Conrad et al. (1992); Zexun y Wei (2000). Estudios previos demuestran que *B. amyloliquefaciens* produce la hormona ácido indolacético (AIA), y que puede actuar en el desarrollo fisiológico de plantas (Choong-Min et al., 2005; Idris et al., 2007).

Tasa de germinación in vitro y emergencia de P. chilensis en invernadero

En la presente investigación, se realizaron estudios para evaluar el efecto de *A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens* (éste ultimo microorganismo indígena de rizósfera de mezquite que se desarrolla en la zona del desierto de Altar Sonora, (Villegas-Espinoza et al., 2008), en condiciones *in vitro* e invernadero en las etapas de germinación y de plántula. Una primera etapa para la generación de una nueva planta es la germinación-emergencia, estudios relacionados con la germinación de halófitas, el porcentaje máximo de germinación se realiza conforme el contenido de sales disminuye (Breen et al., 1977; Ungar, 1977; Ungar 1982; Ayala y O'Leary, 1995; Zalba y Peinemann, 1998; Villagra y Cavagnaro, 2005). Un comportamiento similar lo presentan también las semillas de glicófitas (Murillo-Amador et al., 2000). Los resultados del presente estudio mostraron que al evaluar la germinación-emergencia en *Prosopis chilensis*, el porcentaje de germinación se redujo por el efecto de la salinidad, coincidiendo con numerosos estudios, donde arriba del 5% de NaCl (0.856 M), inducen a las semillas a un estado de latencia (Khan et al., 1976; McGraw y Ungar, 1981; Philipupiya y Ungar, 1984; Villagra y Cavagnaro, 2005). Sin embargo, dicho efecto (% germinación) en presencia de NaCl, se vio mitigado por la inoculación de las bacterias, las cuales favorecen diversos procesos fisiológicos de las plantas debido a la producción de hormonas, capaces de influir en la velocidad del metabolismo, así como en la respiración de la semilla y posterior desarrollo de la raíz hospedada según Conrad et al., (1992); Kozyrovskaya et al., (1990); Zexun y Wei, (2000) y Haahtela et al., (1990).

Acorde a la variable tasa de emergencia, sobresalieron las dos bacterias *A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens* en comparación con el control, a una salinidad de 0, 0.25 y 0.5 M NaCl. Se pudo observar que en aquellos tratamientos con bacterias, se alcanzó una tasa de emergencia máxima del 80% a 0 y 0.25 M de NaCl con *A. halopraeferens* en el sexto día; un 80% con la bacteria *B. amyloliquefaciens* en el noveno día (0 M de NaCl) y un 84% al décimo día (0.25 M de NaCl), mientras que un 30% de emergencia final máximo fue alcanzado por el testigo (0 M de NaCl), al sexto día. Asimismo fue detectado que una salinidad por arriba de 0.5 M de NaCl, reduce la tasa de emergencia en tratamientos de ambos inoculantes. Estos resultados coinciden con otra investigación llevada a cabo con especies de *Acacia*, donde se evaluó germinación y emergencia (Brown et al., 2003).

De igual forma, respecto a las variables de longitud radicular, altura de planta, peso fresco y seco, fueron positivos debido a la inoculación de las bacterias en estudio, como también en la tasa de germinación y emergencia (Cuadro 10, 11 y 17, Figuras 15 y 25) comparadas con los tratamientos no inoculados. De la misma manera se reporta, que un grupo importante de reguladores como son las giberelinas, estimula la germinación en halófitas al igual que en glicófitas bajo condiciones de salinidad (NaCl), produciendo efectos positivos como la interrupción de latencia y el incremento de biomasa (Khan, 1971; Ungar, 1987a; Ungar, 1987b; Ungar, 1982; Ondarza, 1996, Ungar, 2000; Bacilio et al., 2006). Asimismo por que *B. amyloliquefaciens* ha sido aislada de plantas costeras (Vazquez et al., 2000), la cual también tiene la capacidad de

solubilizar fosfatos. También se han realizado estudios donde *B. amyloliquefaciens* tiene la capacidad de ser antagonista para hongos y bacterias causantes de algún tipo de enfermedad para diversos cultivos (Yoshida et al., 2001).

Altura de planta, Longitud radicular de planta, Peso fresco y seco de planta, Peso fresco y seco de raíz y Unidades formadoras de colonias (UFC/mL) en estudio in vitro y de emergencia en invernadero

En altura de planta, a 0 M de NaCl, se observó que el control disminuyó su altura en comparación con los dos tratamiento inoculados (*A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens*) los cuales presentaron un 39.43% más de altura (Cuadro 14). De igual forma, la variable del porcentaje de emergencia, la altura fue afectada negativamente conforme la salinidad se incrementó.

Los tratamientos con las bacterias *A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens*, sobresalen en comparación con el control. La elongación de la raíz a partir de una salinidad de 0.25 a 0.5 M de NaCl es afectada por la presencia de NaCl, pudiéndose deber a que la salinidad provoca estrés en la planta según Esashi (1991); Glick et al. (1999) ya que este tipo de stress ambiental puede promover una alta presencia de etileno en la planta (Holguín et al., 2003).

Acorde a la variable peso fresco, los resultados de los tratamientos estudiados a una salinidad de 0 M de NaCl presentaron valores similares (sin diferencia significativa); Lo contrario fue observado ($P < 0.05$) a una salinidad de 0.25 y 0.5 M de NaCl con las dos bacterias en estudio (*A. halopraeferens* y *B.*

amyloliquefaciens) en comparación con el control. Estos resultados coinciden con investigaciones donde se estimuló, el crecimiento utilizando como inoculante una cepa (R1B) (no identificada), la cual incrementó el peso fresco en 277% en lechuga (Peña y Reyes, 2007). Por otra parte, en peso seco de planta, los resultados indican que no existe diferencia significativa con las dos bacterias *A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens* en comparación con el control, ya que presentaron valores parecidos a las cuatro salinidades de 0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl.

En base a lo anterior, respecto a las variables de longitud radicular, altura de planta, peso fresco y seco, los resultados evidencian que los efectos por la inoculación de las bacterias en estudio fueron positivos comparado con el tratamiento no inoculado. Esto principalmente, a un grupo importante de reguladores que son producidas por los inoculantes, como son las giberelinas, que estimulan la germinación en halófitas al igual que en glicófitas bajo condiciones de salinidad (NaCl), produciendo efectos positivos como la interrupción de latencia y el incremento de biomasa (Khan, 1971; Ungar, 1982; Ungar, 1987a; Ungar, 1987b; Ondarza, 1996, Ungar, 2000; Bacilio et al., 2006). Asimismo por que *B. amyloliquefaciens* ha sido aislada de plantas costeras (Vazquez et al., 2000), la cual también tiene la capacidad de solubilizar fosfatos. También se han realizado estudios donde esta bacteria *B. amyloliquefaciens* tiene la capacidad de ser antagonista para hongos y bacterias causantes de algún tipo de enfermedad para diversos cultivos (Murphy et al., 2000; Yoshida et al., 2001; San-Lang et al., 2002).

El número de células adheridas al sistema radicular de las plantas de mezquite chileno fue apreciado de manera significativa con la bacteria *B. amyloliquefaciens*, en comparación con la bacteria *A. halopraeferens* en las diferentes concentraciones estudiadas. No obstante lo anterior, de igual forma la salinidad repercutió con una tendencia de disminución de células bacterianas adheridas al sistema radicular (UFC/g de raíz). Sin embargo, la interacción de bacterias con *Prosopis chilensis*, mostró que *B. amilolyquefasciens* no era tan afectado comparado con *A. halopraeferens*. Esta posible especificidad de asociación planta-bacteria hasta la fecha es discutible de acuerdo con hallazgos publicados por Arsac et al. (1990); Baldani y Dobereiner (1980); Díaz et al. (2001), quienes indican que este tipo de resultados pueden depender de moléculas orgánicas secretadas en el proceso de germinación y emergencia así como del tipo de especie de microorganismo. Tal es el caso del estudio realizado en soya donde se demostró que *B. amyloliquefaciens* fue afín a la colonización debido a los exudados de dicha planta según Yaryura et al. (2008).

22. CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados, en este trabajo se logró determinar la presencia de 19 aislados bacterianos de raíz y suelo de mezquite *P. glandulosa*.

De los aislados bacterianos se consideraron cuatro, debido a su alta capacidad de reducción de acetileno (prueba indirecta de fijación de nitrógeno, presencia sobre medios de cultivo libre de fuente de nitrógeno, crecimiento bajo diferentes condiciones de salinidad y temperatura y solubilización de fosfatos).

Lo anterior indica que existe un nivel de diversidad bacteriana *in situ*. Asimismo, se confirmó que son una fuente de nitrógeno para la planta debido a la suma de interacciones entre diferentes miembros de la comunidad microbiana de la rizósfera existentes en mezquite.

El aislamiento y caracterización de *B. amyloliquefaciens* y otras especies identificadas asociadas a la rizósfera de mezquite son el primer reporte en *P. glandulosa*; es de esperarse que las interacciones *in situ* serán mucho más complejas debido a la gran diversidad microbiana que existe en la rizósfera de la planta de *P. glandulosa*.

El efecto de la salinidad en la germinación de *P. chilensis* es afectado negativamente. Sin embargo, la inoculación de las bacterias *B. amyloliquefaciens* y *A. halopraeferans* mitigan ese efecto negativo, promoviendo la germinación *in vitro* y emergencia en invernadero de *P. chilensis*.

Bajo condiciones *in vitro* y de invernadero, la bacteria *B. amyloliquefaciens* y *A. halopraeferans* resultaron tener compatibilidad para el

genotipo *P. chilensis*, constatándose con diferencias significativas ($P < 0.05$) para las variables de germinación, emergencia y en la tasa de germinación, tasa de emergencia, peso fresco y seco y en los análisis bromatológicos.

El tiempo de escarificación que resultó ser el apropiado en la germinación de *P. chilensis* e interacción con *B. amyloliquefaciens* y *A. halopraeferens* fueron 4 y 6 minutos.

El presente estudio muestra y confirma que la asociación de bacterias benéficas asociadas a la rizósfera de *Prosopis glandulosa*, es un aporte a la investigación sobre la detección de bacterias promotoras de crecimiento vegetal con posible potencial agrícola-forestal, y donde es necesario conocer la influencia positiva sobre las plantas.

Finalmente, es importante mencionar que este tipo de trabajo experimental, contribuye a ampliar el conocimiento en las posibles alternativas de producción de plantas forestales como lo es el mezquite chileno y, efectos en la aplicación de biofertilizantes de interés socio-económico, para regiones con problemas de disponibilidad de agua de buena calidad, como es el caso de los estados de Sonora y la Península de Baja California, en el Noroeste de México.

23. LITERATURA CITADA

- Aceves, N. 1979. El ensalitramiento de los suelos bajo riego. Colegio de Posgraduados, Chapingo, México.
- Aguilar, A., Etchevers, J. D. y Castellanos, J. Z. 1987. Análisis Químico para evaluar la fertilidad del suelo Sociedad Mexicana de la Ciencias del Suelo. Chapingo, México.
- Arsac, J., Lamothe, C. and Fages, J. 1990. Growth enhancement of Maize (*Zea Mays*) through *Azospirillum lipoferum* inoculation: effect of plant genotype and bacterial concentration. *Agronomie*. 10: 640-654.
- Atlas, M. A., y Bartha, R. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Ed. Addison Wesley. México.
- Ayala, F., y J. O'Leary. 1995. Growth and physiology of *Salicornia bigelovii* Torr. At suboptimal salinity. *International Journal of Plant Sciences*. 156: 197-205.
- Bacilio, M., Hernández, J. P. and Bashan, Y. 2006. Restoration of giant cardon cacti in barren desert soil amended with common compost and inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Biol Fertil Soils*. 43: 112-119.
- Bagwell, Ch., Dantzler, M. Bergholz, P. and Llovel, Ch. 2001. Host-specific ecotype diversity of rhizoplane diazotrophs of the perennial glasswort *Salicornia virginica* and selected salt mash grasses. *J. Aquatic Microbiol. Ecology*. 23: 293-300.
- Baldani, V., and Dobereiner, L. 1980. Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biology & Biochemistry*. 12: 443-439.
- Barnes, H. and Blachstock, J. 1973. Estimation of lipids in marine animal and tissues: detailed investigation of sulphophosphovanil method for 'total' lipids. *Journal Experimental Mar Biology and Ecology*. 12: 103-118.
- Bashan, Y, Hernandez, J. P, Leyva, L. A. y Bacilio, M. 2002. Alginate microbeads as inoculant carrier for plant growth-promoting bacteria. *Biol Fertil Soils* 35: 359–368.
- Bashan, Y., and Levanony, H. 1987. Horizontal and vertical movement of *Azospirillum brasilense* Cd in the soil and along the rhizosphere of wheat and weeds in controlled and fiel enviroments. *J. Gen. Microbiol*. 133: 3473-3480.

- Bashan, Y. 1986. Migration of the rhizosphere bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil. *Journal of General Microbiology*. 132: 3407-3414.
- Bashan, Y. and Holguin, G. 1997. *Azospirillum-plant* relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology*. 43: 103-121.
- Bashan, Y., Holguin, G. De-Bashan, L. E. 2004. *Azospirillum-plant* relationship: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology*. 50: 521-577.
- Beinjerinck, W. 1925. Über ein *Spirillum*. *Welches freien tionskr. Adt.* 2. 63: 353-359.
- Ben Dekhil, S., Cahil, E. Stackebrandt, and L. Sly. 1997. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 20: 72-77.
- Besnier, F. 1988. Semillas biología y tecnología. Ediciones Mundi-Prensa. España. pp. 175-179.
- Bidwell, R., J. 1979. Fisiología vegetal, ed. A.G.T. editores S.A.
- Booth, T., Gorrie, S. and Mushin, T. 1988. Life strategies among fungal assemblages on *Salicornia europaea* aggregate. *J. Mycologia*. 2: 176-191.
- Breen, C., Everson, C. y Rogers, K. 1977. Ecological studies on *Sporobolus virginicus* (L) Kunth with particular reference to salinity and inundation. *Hydrobiologia*. 54: 135-140.
- Brock, T., Smith, D. and Madigan, M. 1987. Microbiología cuarta edición. Prentice may. México.
- Brown, J., Enright, N. J. and Miller, B. P. 2003. Seed production and germination in two rare and three common co-occurring *Acacia* species from south-east Australia. *Austral Ecology*. 28: 271-280.
- Burkarlt, A. 1952. Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas. Ed. Science. Vol 29. p. 57.
- Camacho, F. 1994. Dormancia de semillas: causas y tratamientos. Ed. Trillas. México.

- Carrillo, A. 2002. Efecto de *Azospirillum brasilenses* en Cardón. Tesis de Maestría en Uso Manejo y Preservación de los Recursos Naturales. Colombia y Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.). La Paz, B.C.S. México. P. 98.
- Carrillo, A., M. Puente, Castellanos, T. y Bashan, Y. 1998. Aplicaciones biotecnológicas de ecología microbiana In: Manual de laboratorio. (Eds. Pontificia Universidad Javeriana, Santa Fé de Bogotá, Colombia y Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.). La Paz, B.C.S. México. p. 51.
- Chelius, M. and Triplet, E. 2000. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Z. mays* L. Applied and Environmental Microbiology. 66: 783-787.
- Choong-Min, R., Chia-Hui, H. Locy, R. D. and Kloepper, J. W. 2005. Study of mechanisms for plant growth promotion elicited by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana*. Plant and Soil. 268: 285-292.
- Conrad, K., Bettin, B. and Neumann, S. 1992. The cytokinin production of *Azospirillum* and *Klebsiella* possible ecological effects. In: M. Kaminek et al. (eds), Physiology and biochemistry of cytokinins in plants. Symposium Liblice, República de Checoslovaquia. pp. 401-405.
- Cordo, A., y De Leach J. 1987. Departamento de agricultura (*Prosopis* spp). Ed. Paraguay. pp 36-62.
- Das, H. 1991. Biological nitrogen-fixation in the context of indian agriculture. Current Science. 60: 551-555.
- De Coninck, K., Horemans, S. Rombauts, S. and Vlassak, K. 1988. Occurrence and survival of *Azospirillum* spp. in temperate regions. Plant Soil. 110: 213-218.
- Devlin, R. M. 1980. Fisiología vegetal. ed. OMEGA, México, D.F.
- Díaz, P., Ferrara, R. Almaraz, J. J. y Alcántar, G. 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. Terra Latinoamericana. 19: 327-335.
- Dobbelaere, S., A. Croonenborghs, A. Thys, D. Ptacek, J. Vanderleyden, P. Dutto, C. Lavandera-Gonzalez and J. Caballero-Mellado. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. Australian Journal of Plant Physiology. Vol. 28. pp. 871-879.

- Döbereiner, J., Marriel, I. and Nery, M. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. Canadian Journal Microbiology. 22: 1464-1473.
- Drozdowiez, A., and Ferreira, S. 1987. Nitrogenase activity in mixed cultures of *Azospirillum* with other bacteria. Zentralblatt für Mikrobiologie. 142: 487-493.
- Esashi, Y. 1991. Ethylene and seed germination. In: Matto, A.K. and Suttle, J.C. (ed.). The plant hormone ethylene. CRC Press. Florida, USA. p. 133-157.
- Fages, J. 1992. An industrial view of *Azospirillum* inoculants: formulation and application technology. Symbiosis, 13: 15-26.
- Falk, E., Johnson, J. Baldani, V. Döbereiner, J. and Krieg, N. 1986. Deoxyribonucleic and ribonucleic acid homology studies of the genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. Int. J. Syst. Bacteriol. 36: 80-85.
- Fallik, E., Okon, Y. and Fisher, M. 1988. Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation: Effect of soil organic matter content, number of rhizosphere bacteria and timing of inoculation. Soil Biology & Biochemistry, 20: 45-49.
- FAO, 1998. Red Latinoamericana de Cooperación Técnica en Sistemas Agroforestales. Especies Arbóreas y Arbustivas para las zonas Áridas y Semiáridas de América Latina. <http://rlc.fao.org/redes/sisag/arboles/Arg-p-ch.htm>.
- Felker, P., Clark, P. R. Laag, A. E. and Pratt, P. F. 1981. Salinity tolerance of the tree legumes mesquite (*Prosopis glandulosa* var *torreyana*, *P. velutina*, and *P. articulate*) algarrobo (*P. chilensis*), Kiawe (*P. pallida*) and tamarugo (*P. tamarugo*) grown in sand culture on nitrogen free media. Plant and Soil. 61: 311-317.
- Ferrera-Cerrato, R., y Alarcón, A. 2001. La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. Ciencia Ergo Sum. 8: 175-183.
- Frioni, L. 1999. Procesos microbianos. Fijación biológica del nitrógeno por diazotrofos en vida libre y en la rizosfera. Editorial de la fundación Universidad Nacional de Río Cuarto argentina.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Offset Larios, México, D.F.
- Glick, B. R., Patten, C. L. Holguin, G. and Penrose, D. M. 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press, London, England. p. 267.

- Golubov, J., Mandujo, M, Eguiarte, L E. 2001. The paradox of mesquites (*Prosopis* spp):invading species of biodiversity enhancers? Bol. Soc. Bot. Mex. 69: 21-28.
- Goodfriend, W., Olsen, M. and Frye, R. 2000. Soil microfloral and microfaunal response to *Salicornia bigelovii* planting density and soil residue amendment. Plant and Soil. 1: 23-32.
- Haahtela, K., Ronkko, R. Laaskso, T. Williams, P. and Korhonen, T. 1990. Root-associated *Enterobacter* and *Klebsiella* in *Poa pratensis*: Characterization of an iron-scavenging system and a substance stimulating root hair production. Molecular Plant-Microbe Interaction. 3: 358-365.
- Haahtela, K., Wartiovaara, T. Sundman, V. and Skujins, J. 1981. Root-associated N₂ fixation (acetylene reduction) by *Enterobacteriaceae* and *Azospirillum* strains in cold-climate spodosols. Appl. Environ. Microbiol. 41: 203-206.
- Halsall, D. and Gibson, A. 1989 Nitrogenase activity of a range of diazotrophic bacteria on straw breakdown products and related compounds. Soil Biology & Biochemistry. 21: 291-298.
- Hamdi, H. 1999. Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in Arid Climate. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 63: 968-989.
- Hardy, R., Holsten, R. Jackson, E. and Burns, R. 1968. The acethilene-ethilene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. Plant Physiology. 43: 1185-1207.
- Hartmann, A., Stoffels, M. Eckert, B. Kirchhof, G. and Schloter, M.. 2000. Analysis of the presence and diversity of diazotrophic endophytes, p. 727-. En E. W. Triplett (ed.), Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for analysis of a biological process. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
- Heiseke, D. 1984. Regeneración por rebrotes en dos tipos de matorral mediano subinermes de la región de Linares, N.L. Fac. Silvicultura, Manejo Rec. Renov. UANL. México. p.17.
- Henderson, M. E. K. and Duff, R. B. 1963. The release of metallic and silicate ions from minerals, rocks, and soils by fungal activity. Journal of Soil Science. 14: 236-246.
- Hilderbrandt, U., Janetta, K. Ouziad, F. Renne, B. Nawrzth, K. and Bothe, H. 2000. Arbuscular mycorrhizal colonization of halophytes in Central European salt marshes. J. Mycorrhiza. 4: 175-183.

- Holguin, G., and Bashan, Y. 1996. Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp). *Soil Biol. Biochem.* 28: 1651-1660.
- Holguín, G., Bashan, Y. Puente, E. Carrillo, A. Bethlenfalvay, G. Rojas, A. Vázquez, P. Toledo, G. Jiménez, M. B. Glick, B. R. Gonzáles de Bashan, L. Lebsky, V. Moreno, M. y Hernández, J. P. 2003. Promoción del crecimiento en plantas por bacterias de la rizósfera. *Agricultura Técnica en México.* 29: 201-211.
- Holguin, G., Guzman, M. A. and Bashan, Y. 1992. Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangroves trees, isolation, videntification and in vitro interaction with rhizosphere *Staphylococcus* sp. *FEMS Microbiology Ecology.* 101: 207-216.
- Idris, E. E., Iglesias, D. J. Talon, M. and Borriss, R. 2007. Tryptophan-Dependent Production of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Affects Level of Plant Growth Promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *MPMI.* 20: 619-626.
- INE (Instituto Nacional de Ecología). 1994. Mezquite *Prosopis* spp. Cultivo alternativo para las zonas áridas y semiáridas de México. Primera edición. Comisión nacional de las zonas áridas. Instituto Nacional de Ecología de México. México D. F.
- Isopi, R., Fabbri, P. Del Gallo, M. and Puppi, G. 1995. Dual inoculation of *Sorghum bicolor* (L). *Moench* spp. bicolor with vesicular arbuscular mycorrhizae and *Acetobacter diazotrophicus*. *Symbiosis.* 18: 43-55.
- Jiménez, R., Virgen. G. Tabares, F. y Olalde, V. 2001. Bacterias promotoras de crecimiento de plantas: agro-biotecnología. *Avance y Perspectiva.* 20: 395-400.
- Khammas, K., and Kaiser, P. 1992. Pectin decomposition and associated nitrogen fixation by mixed cultures of *Azospirillum* and *Bacillus* species. *Canadian Journal Microbiology,* 38: 794-797.
- Kapulnik, Y., Okon, Y. and Kigel, J. 1981. Effects of temperature, nitrogen fertilization and plant age on nitrogen fixation by *Setaria italica* inoculated with *Azospirillum brasilense* (strain cd). *Plant Phisiology.* 68: 340-343.
- Khammas, M., Ageron, E. Grimont, P. and Kaiser, P. 1989. *Azospirillum irakense* sp. Nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Res. Microbiol.* 140: 679-693.
- Khan, A., Gul, B. and Weber, D. 1971. Germination responses of *Salicornia rubra* to temperature and salinity. *Journal of Arid Enviroments.* 45: 207-214.

- Khan, M., Khan, I. and Khizar, T. 1976. Plant growth regulators from species differing in salt tolerance as affected by soil salinity. *Plant Soil*. 45: 269-276.
- Kloepper, W., Schippers B. and Bakker, P. 1992. Proposed elimination of the term endorhizosphere. *Phytopathology*. 82: 726-727.
- Kozyrovskaya, N., Makitruk, V. and Rukdashel, E. 1990. Nitrogen fixing *Klebsiella*- spp produces IAA. *Biopolim Kletka*. 6: 93-96.
- Ladha, J., Barraquio, W. and Watanabe, I. 1983. Isolation and identification of nitrogen-fixing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella planticola* associated with rice plants. *Canadian Journal of Microbiology*. 29: 1301-1308.
- Lieth, H., and Masoom, A. 1993. Towards the rational use of high salinity tolerant plants. In: *Tasks for vegetation Science*, Vol. 28. Kluwer Academic Publisher.
- López, G. F. 1992. *Microbiología Agrícola*. Ed. Universidad Autónoma Chapingo. Primera edición. pp. 13-66.
- López-Franco, Y. L., Goycoolea, F. M. Valdez, M. A. Calderon de la Barca, A. M. 2006. Goma de mezquite: una alternativa de usos industrial. *Interciencia*. 31: 183-189.
- Madigan, M. T., Martinko, J. y Parker, J. 2006. *Biología de los microorganismos*. 10 edición. Pearson Prentice Hall. España.
- Magalhães, F., Baldani, J. Souto, S. Kuykendall, J. and Döbereiner, J. 1983. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *An. Acad. Brasil. Cienc.* 55: 417-430.
- Maguire, J. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*. 2:176-177.
- Malik, K. A. 1988. A new freeze-drying method for the preservation of nitrogen-fixing and other fragile bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 8: 259-271.
- Manovsky, E. 1982. *Identificación de bacterias fitopatógenas*. Universidad Autónoma Chapingo. México, D.F.
- Martínez, B. 1996. Producción agraria ecológica. En: *Revista de desarrollo rural y cooperativismo agrario*. Universidad de Zaragoza. Vol. 5. <http://cederul.unizar.es/revista/inicio.htm>.

- Mas, J.F., Velázquez, A. Díaz, J.R. Mayorga, R. Alcántara, C. Castro R. y Fernández, T. 2002. Monitoreo de los cambios de cobertura en México, CD de las memorias del II Seminario Latinoamericano de Geografía Física, Maracaibo, Venezuela, 24-27 de julio de 2002.
- Mascarua-Esparza, M. A., Villa-Gonzalez, R. and CaballeroMellado, J. 1988. Acetylene reduction and indoleacetic production by *Azospirillum* isolates from Cactaceous plants. *Plant and Soil*. 106: 91-95.
- Mc Graw, D., and Ungar, I. 1981. Growth and survival of the halophyte *Salicornia europaea* L. under saline field conditions. *Ohio Academic Science*. 81: 109-113.
- Medina, C., and Cardemil, L.1993. *Prosopis chilensis* is a plant highly tolerant to heat shock. *Plant Cell Environ*. 16: 305-310.
- Meloni, D. A., Gulotta, M. R. Martinez, C. A. and Oliva, M. A. 2004. The effects of salt stress on growth, nitrate reduction and proline and glycinebetaine accumulation in *Prosopis alba*. *Braz. J. Plant Physiol*.16: 39-46.
- Murillo-Amador, B., Troyo-Diéguez, E. Jones, H. G. Ayala-Chairez, F. Tinoco-Ojanguren, C.L. and López-Cortés, A. 2000. Screening and classification of cowpea genotypes for salt tolerance during germination. *PHYTON. International Journal of Experimental Botany*. 67: 71-84.
- Murphy, J. F., Zehnder, G. W. Schuster, D. J. Sikora, E. J. Polston, J. E. and Kloepper, J. W. 2000. Plant Growth-Promoting Rhizobacterial Mediated Protection in Tomato Against *Tomato mottle virus*. *Plant Dis*. 84: 779-784.
- Ondarza, R. 1996. *Biología moderna*. ed. Trillas.México, D.F. p. 633.
- Parke, J. 1991. Root colonization by indigenous and introduced microorganisms. In: the rizosphere and plant growth. D.L. Keister and P.B. Cregan (Eds) Kluwer Academic Publishing. The Netherlands.
- Pelczar, M. J., y Chan, E. C. S. 1981. *Elementos de microbiología*. McGraw-HILL. México. pp. 627-646.
- Peña, H. B. y Reyes, I. 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.
- Pérez, S. y Torralba, A. 1997. La fijación del Nitrógeno por los seres vivos. Seminario Fisiología Vegetal 21/01. Facultad Biología Oviedo. p. 21.

- Philipupiya, J. and Ungar, I. 1984. The effect of seed dimorphism on the germination and survival of *Salicornia*. *American Journal Botany*. 71: 542-549.
- Puente, M. E., y Bashan, Y. 1993. Effects of inoculation with *Azospirillum brasilense* Straits on the germination and seedlings growth of the giant columnar Cardon cactus (*Pachycereus pringlei*). *Symbiosis*. 15: 49-60.
- Rao, A. V., y Venkateswarlu, B. 1982. Associative simbiosis of *Azospirillum lipoferum* with dicotyledonous succulent plants of the Indian desert. *Can. J. Microbiol.* 28: 778-782.
- Reinhold, B., Hurek, I. Fendrik, B. Pot, M. Gillis, K. Kersters, S. Thielemans, and De Ley, J. 1987. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 43-51.
- Rennie, R. J. 1981. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen- fixing) bacteria from soils. *Canadian Journal of Microbiology*. 27: 8-14.
- Rodríguez, E. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 990-991.
- Rojas, A., Holguin, G. Glick, B. and Bashan, Y. 2001. Synergism between *Phyllobacterium* sp (N₂-fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhyzosphere. *Microbiol. Ecol.* 35: 181-187.
- Rönkkö, R., Smilander, A. and Haahtela, K. 1993. Frankia in the rhyzosphere of non host plants: A comparison with root-associated N₂ fixing *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Pseudomonas*. *Plant Soil*. 153: 85-95.
- Rzedowski, J. 1983. Vegetación de México . Ed. LIMUSA, México, D.F. p.432.
- Rzedowski, J. 1988. Análisis de la distribución geográfica del complejo *Prosopis* en Norteamérica. *Acta Botánica Mexicana*. 3: 7-19.
- Sacon, B. 1993. Fisiología y bioquímica vegetal. ed. Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid, España.
- Salisbury, F. y Ross, C. 1994. Fisiología vegetal. Ed. Iberoamericana S.A. México.

- San-Lan, W., Ing-Lung, S. Tze-Wun, L. and Chi-Hau, W. 2002. Purification and Characterization of Two Antifungal Chitinases Extracellularly Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a Shrimp and Crab Shell Powder Medium. J. Agric. Food Chem. 50: 2241-2248.
- SAS Institute. 2001. SAS/STAT User's Guide. Version 6.12 SAS Institute, Cary, NC.
- Shloter, M. and Hartmann, A. 1998. Endophytic and surface colonozation of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studies with strains specific monoclonal antibodies. Symbiosis. 25: 159-179.
- Sly, L., and Stackebrandt, E. 1999. Description of *Skermanella parooensis* gen. nov., sp. nov. to accommodate *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* following the transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum*. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 541-544.
- Smith, R. S. 1992. Legume inoculant formulation and application. Can. J. Microbial. 38: 485-492.
- Sokal, R., and James R. 1988. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. (3rd edn). Freeman & Co, San Francisco, CA.
- Solis, G. y Espericueta, M. 2005. Utilización y aprovechamiento del mezquite (*Prosopis*) en Sonora. Biotecnia. Vol. 8. Rev. de la Div. de Cs. Biológicas y de la Salud de la Universidad de Sonora. p. 11.
- Sosa, L., Llanes, A. Reinoso, H. Reninato, M. and Luna, V. 2005. Osmotic and specific ion effects on the germination of *Prosopis strombulifera*. Annals of Botany. 96: 261-267.
- Squires, V. 1994. Overview of problems and prospect for utilizing halophytes as a resource for livestock and for rehabilitation of degraded lands. Ed. Kluwer. Academic Publishers. Netherlands.
- Sundara-Rao, W., and Sinha, M. 1963. Phosphate dissolving micro-organisms in the soil and rhyzosphere. Indian J. Microbiol. 41: 999-1011.
- Tarrand, J., Krieg, N. and Döbereiner, J. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. Nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. Nov. and *Azospirillum brasilense* sp. Nov. Canadian Journal Microbiology. 24: 967-980.

- Tyler, M., Milam, J. Smith, R. Schank, S. and Zuberer, D. A. 1979. Isolation of *Azospirillum* from diverse geographic regions. *Canadian Journal Microbiology*. 25: 693-697.
- Ungar, I. 1977. Salinity, temperature and growth regulator effects on seed germination of *Salicornia europaea* L. *Aquatic Botany*. 3: 329-335.
- Ungar, I. 1982. Germination ecology of halophytes. *Tasks for vegetation science*. Vol. 2 ed. By D.N.S. Ohio, USA. P. 143-154.
- Ungar, I. 1987a. Population characteristic, growth and survival of the halophyte *Salicornia*. *Ecology*. 68: 569-575.
- Ungar, I. 1987b. Population ecology of halophyte seeds. *Botany Review*. 53: 301-308.
- Ungar, I. 2000. *Ecophysiology of vascular halophytes*. Department of Botany. Ohio University. Athens Ohio. CRC Press, p. 209.
- Universidad Autónoma de Chiapas. 2001. *Manual de Análisis de Suelo-Planta-Agua. Diagnóstico, Interpretación y Recomendaciones*. México.
- Vazquez, P., Holguin, G. Puente, M. E. Lopez-Cortes, A. and Bashan, Y. 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves growing in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils*. 30: 460-468.
- Velarde, M., Felker, P. and Degano, C. 2003. "Evaluation of Argentine and Peruvian *Prosopis* germplasm for growth at seawater salinities". *Journal of Arid Environments* 55: 515-531.
- Velázquez, A., Mas, J. F. Díaz Gallegos, J. R. Mayorga Saucedo, R., Alcántara, P. C Castro, R. Fernández, T. Bocco, G. Ezcurra, E. y Palacio, J. L.. 2002. Patrones y tasas de cambio de uso del suelo en México. *Gaceta ecológica* 62: 21-37.
- Villagra, E. P., and Cavagnaro, J. B. 2005. Effects of salinity on the establishment and early growth of *Prosopis argentina* and *Prosopis alpataco* seedlings in two contrasting soils: Implications for their ecological success. *Austral Ecology*. 30: 325-335.
- Villegas-Espinoza, J. A., Rueda-Puente, E. O., Puente, M. E., Muñiz-Salazar, R., Avilés-Marín, S. M., Grimaldo-Juárez, O., Murillo-Amador, B. y P. Preciado-Rangel. 2008. First report of plant growth promoting bacteria from mesquite (*prosopis glandulosa*) rhizosphere on volcanos of sonora

- desert. 12 International Symposium on Microbial Ecology. Cairns Australia 15-25 agosto.
- Will, M., and Sylvia, D. 1990. Interaction of rhizosphere bacteria, fertilizer and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi with sea oats. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2071-2079.
- Yaryura, P. M., León, M. Correa, O. S. Kerber, N. L. Pucheu, N. L. and García, A. F. 2008. Assessment of the Role of Chemotaxis and Biofilm Formation as Requirements for Colonization of Roots and Seeds of Soybean Plants by *Bacillus amyloliquefaciens* BNM339. Curr Microbiol. 56: 625-632.
- Yoshida, S., Hiradate, S. Tsukamoto, T. Hatakeda, K. and Shirata, A. 2001. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. Phytopathology 91: 181-187.
- Zalba, P. and Peinemann, N. 1998. Salinity- fertility interactions on early growth of maize (*Zea mays* L.) and nutrient uptake. Edafología. 5: 29-39.
- Zexun, L., and Wei, S. 2000. Effect of cultural conditions on IAA biosynthesis by *Klebsiella oxytoca* SG-11. Chinese Journal of Applied and Enviromental Biolgy. 6: 66-69.

24. ANEXOS

Cartel publicado

12th Simposio Internacional de Ecología Microbiana en Cairns, Australia

**25. FIRST REPORT OF PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA FROM
MESQUITE (*Prosopis* spp.) RHIZOSPHERE FROM VOLCANS OF SONORA
DESERT**



FIRST REPORT OF PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA FROM MESQUITE (*Prosopis* spp.) RHIZOSPHERE FROM VOLCANOS OF SONORA DESERT

J.A. Villegas Espinoza¹, E. Rueda Puente², M.E. Puente-Puente³, R. Muñiz Salazar¹, S.M. Avilés Marín⁴, O. Grimaldo Juárez⁴, B. Murillo-Amador⁵, P. Preciado-Rangel⁶

¹Universidad Autónoma de Baja California, Investigación y Posgrado, Mexicali, México, ²Universidad de Sonora, Agroadministration, Santa Ana, Sonora, ³Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Microbiología Ambiental, La Paz, B.C.S Mexico, ⁴Universidad Autónoma de Baja California, Investigación y Posgrado, Mexicali, Mexico, ⁵Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Zonas Áridas, La Paz, B.C.S. México, ⁶Universidad Tecnológica de Torreón, Investigación y Posgrado, Torreón, México.

INTRODUCTION

Bacteria with the ability to grow on nitrogen-free media and with nitrogenase activity under microaerobic conditions were isolated from mesquite (*Prosopis glandulosa*) roots and soil collected, which it growth in craters of volcanoes of Sonora desert, and revealed for first time.

MATERIAL AND METHODS

Five areas in and around the volcanoes of the Sonora desert, were sampled to detect nitrogen-fixing bacteria associated with mesquite.

RESULTS AND CONCLUSIONS

from these, 16 colonies were isolated. Only one showed high acetylene reduction activity and capacity to solubilize fosfatos. This bacterium was identified as *Bacillus amyloliquefasciens*.



Sampled of *Prosopis* spp rhizosphere, which are growth on Volcans were obtained in Sonora desert and Isolated of Plant growth promoting bacteria was carried out.

RESULTS AND CONCLUSIONS

Our results suggest that *Bacillus* isolate have a particular affinity to growth at 0.0 to 0.75 M of NaCl and 30 to 55°C. The effects of *Bacillus amyloliquefasciens* were evaluated at the germination stage of *P. chilensis*, as an alternative unarmed tree to reforest kinder-gardens child schools located in communities of dry and saline's areas of the Sonora desert in México. This bacterium, in conjunction with *Azospirillum halopraeferens*, was tested for growth-promoting ability when inoculated on *P. chilensis* under various saline concentration conditions. During germination stage *B. amyloliquefasciens*, showed high specificity for the *P. chilensis*. This is the first report of *B. amyloliquefasciens* as a nitrogen-fixing bacterium associated with the halophyte *P. juliflora* which it growth in craters of volcanic zone of Sonora desert. A reliable biological method, based on beneficial bacteria, is suggested to help maintain or improve the fertility of soils to reproduce *Prosopis* spp. as an important resource in many arid and semiarid regions of the world.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), specifically the program 'Consolidación Institucional Convocatoria 2004-CONACyT' of Repatriación, Retención, code 040147 Dr. E-Rueda. Thanks to the Universidad de Sonora and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología- Comisión Nacional Forestal trough Project code 14651: Bacterias promotoras del crecimiento de plantas asociadas a ambientes árido-salinos y su efecto en la reproducción de mezquite sonorense y chileno" and CONACyT Scholarship: 206653 and Apoyos Complementarios para la Consolidación Institucional de Grupos de Investigación (Estancias de Consolidación) CONVOCATORIA 2007-code: 74592 del Dr. Bernardo Murillo Amador from CIBNOR.

ARTÍCULOS PUBLICADOS Y ENVIADOS EN REVISTAS INDEXADAS**REVISTA UNIVERSIDAD Y CIENCIA**

Isolation of plant growth promoting bacteria from mesquite (*Prosopis glandulosa*) rhizosphere on volcanos of Sonora desert.

Aislamiento de bacterias promotoras de crecimiento de plantas de la rizósfera de mezquite (*Prosopis glandulosa*), en volcanes del desierto de Sonora
enviado

REVISTA TROPICAL AND SUBTROPICAL AGROECOSYSTEMS

EFFECTO DE LA INOCULACIÓN DE *Azospirillum halopraeferens* Y *Bacillus amyloliquefaciens* EN LA GERMINACIÓN DE *Prosopis chilensis*.

EFFECT OF THE INOCULATION OF *Azospirillum halopraeferens* and *Bacillus amyloliquefaciens* IN GERMINATION OF *Prosopis chilensis*
12 (2010): 19-32

REVISTA INTERCIENCIA

EFFECTO DE LA INOCULACIÓN DE *Azospirillum halopraeferens* y *Bacillus amyloliquefaciens* EN LA EMERGENCIA DE *Prosopis chilensis*.

EFFECT OF THE INOCULATION OF *Azospirillum halopraeferens* and *Bacillus amyloliquefaciens* IN EMERGENCY OF *Prosopis chilensis*
enviado

26. Isolation of plant growth promoting bacteria from mesquite (*Prosopis glandulosa*) rhizosphere on volcanos of Sonora desert

Aislamiento de bacterias promotoras de crecimiento de plantas de la rizósfera de mezquite (*Prosopis glandulosa*), en volcanes del desierto de Sonora

J A Villegas-Espinoza, E O Rueda-Puente *, M E Puente-Puente, P Preciado-Rangel, B Murillo-Amador , R Muñoz-Salazar, S M Avilés-Marín and O Grimaldo-Juárez

(JAVE) Student of Doctorate Universidad Autónoma de Baja California. Ejido Nuevo León, Mexicali, Baja California, México. CP 21705. villegasjorge_a@hotmail.com

(EORP) Universidad de Sonora, Campus Santa Ana, Carretera Internacional y 16 de septiembre s/n, Santa Ana, Sonora, México CP 84600. erueda04@santana.uson.mx

(MEPP) (BMA) Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo Santa Rita, La Paz, Baja California Sur CP 23090. Grupo de Microbiología ambiental. epuente04@cibnor.mx, bmurillo04@cibnor.mx

(PPR) Instituto Tecnológico Agropecuario No. 10. Carretera Torreón- San Pedro Km. 7.5. Torreón Coahuila, Apartado Postal 27, ppreciador@yahoo.com.mx

(RMS) (SMAM) (OGJ)_Departamento de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Baja California. Ejido Nuevo León, Mexicali, Baja California, México. Apartado postal 21705. ogrimaldoj@hotmail.com, monikaviles@hotmail.com, ramusal@yahoo.com.mx.

* Corresponding author: Edgar Omar Rueda-Puente. Department of Agro - Administration. Universidad de Sonora-Campus Santa Ana, Carretera Internacional y Avenida 16 de septiembre s/n, Col. La Loma, Santa Ana, Sonora, México. C.P. 84600. Tel-Fax. 01-641-324-1242. erueda04@santana.uson.mx

Titulo corto: Aislamiento de bacterias benéficas de la rizósfera de mezquite (*Prosopis glandulosa*)

Tittle running: Beneficial bacteria from rhizosphere of mesquite (*Prosopis glandulosa*)

27. EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE *Azospirillum halopraeferens* Y *Bacillus amyloliquefaciens* EN LA GERMINACIÓN DE *Prosopis chilensis*

Tropical and Subtropical Agroecosystems, 12 (2010): 19 - 32

**Tropical and
Subtropical
Agroecosystems**

EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE *Azospirillum halopraeferens* Y *Bacillus amyloliquefaciens* EN LA GERMINACIÓN DE *Prosopis chilensis*

[EFFECT OF THE INOCULATION OF *Azospirillum halopraeferens* and *Bacillus amyloliquefaciens* IN GERMINATION OF *Prosopis chilensis*]

J.A. Villegas-Espinoza¹, E.O. Rueda-Puente^{2*}, B. Muñillo-Amador³,
M.E. Puente³, O. Grimaldo-Juárez⁴, S.M. Avilés-Marín⁴
and J.F. Ponce Medina⁴

¹ Estudiante de Doctorado-Departamento de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Baja California. Ejido Nuevo León, Mexicali, Baja California, México. Apartado postal 21705. Email: villegasjorge_a@hotmail.com

² Universidad de Sonora, Campus Santa Ana, Carretera internacional y 16 de septiembre s/n, Santa Ana, Sonora, México. Apartado postal 84600. Email: erueda04@santana.uson.mx.

³ Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo Santa Rita, La Paz, Baja California Sur. Apartado postal 23090. Email: epuente04@cibnor.mx, bmunillo04@cibnor.mx

⁴ Departamento de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Baja California. Ejido Nuevo León, Mexicali, Baja California, México. Apartado postal 21705. Email: ogrimaldoj@hotmail.com monikaviles@hotmail.com, jfponce8@hotmail.com

*Corresponding author

RESUMEN

Las Bacterias Promotoras de Crecimiento de Plantas (BPCP), son microorganismos fijadores de nitrógeno atmosférico y a su vez producen hormonas que aprovechan las plantas para llevar a cabo su desarrollo. Es importante la utilización de microorganismos benéficos para reducir la fertilización química. La investigación científica ha incrementado la búsqueda y aislamiento de BPCP de regiones específicas como son las zonas áridas, ya que estos microorganismos están adaptados a ambientes extremos. La especie *Prosopis chilensis* está siendo utilizada para reforestación de escuelas, parques y también como ornato; para reproducir esta planta se está utilizando fertilizantes químicos que son dañinos al medio ambiente. El objetivo de la presente investigación, consistió en analizar el efecto de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal *Bacillus amyloliquefaciens* y *Azospirillum halopraeferens* en la germinación y emergencia del mezquite chileno (*P. chilensis*) bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl). Se obtuvieron semillas de mezquite chileno de la región de Santa Ana, Sonora, México. Bajo condiciones de laboratorio se evaluó el porcentaje de germinación, tasa de germinación, altura, longitud radicular de plántula, peso fresco de plántula número de células bacterianas adheridas al sistema radicular. Bajo condiciones de invernadero, las variables evaluadas fueron porcentaje de emergencia, tasa de emergencia, altura y longitud radicular, peso fresco y seco de planta, peso fresco y seco de raíz, número de

células bacterianas adheridas al sistema radicular. Los resultados indican que, en condiciones *in vitro*, el porcentaje y tasa de germinación disminuyó conforme la salinidad se incrementa. Sin embargo, estas variables cambiaron positivamente por *A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens*; la altura de plántula y longitud radicular fueron incrementadas con la bacteria *B. amyloliquefaciens*, en las salinidades (0, 0.25 y 0.5 M de NaCl). Los resultados obtenidos en invernadero, muestran que, el porcentaje y tasa de emergencia, fueron afectados positivamente por las dos bacterias (*A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens*) en *P. chilensis*, como también se presentó un buen desarrollo en altura de planta, longitud radicular, peso fresco y seco. Sin embargo es importante hacer notar que bajo condiciones de invernadero, se logró obtener que los inoculantes resultasen ser más efectivos en las variables estudiadas.

Palabras clave: fijación de nitrógeno; *Bacillus amyloliquefaciens*; *Prosopis chilensis*; *Azospirillum halopraeferens*; salinidad.

SUMMARY

The Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) are microorganisms atmospheric nitrogen fixing and produce hormones that take advantage of the plants to carry out their development. The use of beneficial microorganisms is important to reduce the chemical fertilization. The scientific research has been

28. EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE *Azospirillum halopraeferens* y *Bacillus amyloliquefaciens* EN LA EMERGENCIA DE *Prosopis chilensis*

EFFECT OF THE INOCULATION OF *Azospirillum halopraeferens* and *Bacillus amyloliquefaciens* IN EMERGENCY OF *Prosopis chilensis*

Jorge A. Villegas-Espinoza, Edgar O. Rueda-Puente*, B. Murillo-Amador, O. Grimaldo-Juárez, María E. Puente, Silvia M. Avilés-Marín, J. F. Ponce-Medina, G. González-Aguilar.

Jorge Arnoldo Villegas-Espinoza. Estudiante de Doctorado-Departamento de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Baja California. Ejido Nuevo León, Mexicali, Baja California, México. C. P. 21705. villegasjorge_a@hotmail.com.

Edgar Omar Rueda-Puente. Ingeniero M. en C., Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN)–Campus Saltillo, Doctor en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales. Investigador Titular de la División de Ciencias Administrativas Contables y Agropecuarias. Universidad de Sonora, Campus Santa Ana, Carretera internacional y 16 de septiembre s/n, Santa Ana, Sonora, México. Apartado postal 84600. Miembro del Sistema Nacional de Investigadores. erueda04@santana.uson.mx.

Bernardo Murillo-Amador. M. en C., Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN)–Campus Saltillo, Dr. en Ciencias, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Investigador Titular del Programa de Agricultura en Zonas áridas. CIBNOR. Miembro del Sistema Nacional de Investigadores. bmurillo04@cibnor.mx.

Onecimo Grimaldo-Juárez. Licenciatura con especialidad en Fitotecnia en la Universidad Autónoma Chapingo. Maestría y Doctorado en el Colegio de Postgraduados con especialidad en Genética Vegetal Diplomado en Horticultura Protegida por la Universidad de Almería España. Universidad Autónoma de Baja California. Instituto de Ciencias Agrícolas. Carretera a Delta s/n C.P. 21705 Ejido Nuevo León, Baja California, México. ogrimaldoj@hotmail.com.

María Esther Puente. Doctorado en Ciencias Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales (Orientación en Ecología). Miembro del sistema Nacional de Investigadores. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo de Santa Rita Apdo. Postal 128; La Paz, BCS 23090, México. epuente04@cibnor.mx.

Silvia Mónica Avilés-Marín. Licenciada en Biología, con Mención Honorífica Facultad de Estudios Superiores “Zaragoza”, Universidad Nacional Autónoma de México. Maestra en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Montecillos, Texcoco. Doctora en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Montecillos, Texcoco. Universidad Autónoma de Baja California. Instituto de Ciencias Agrícolas. Carretera a Delta s/n C.P. 21705 Ejido Nuevo León, Baja California, México. monikaviles@hotmail.mx.