

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
Instituto de Ciencias Agrícolas



REPRODUCCIÓN DE PALO FIERRO (*Olneya tesota* A. Gray) E INTERACCIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL EN EL DESIERTO DE ALTAR, SONORA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA:

MARICELA DUARTE MEDINA

DIRECTOR DE TESIS

DR. EDGAR OMAR RUEDA PUENTE

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA

DICIEMBRE DE 2012

La presente tesis titulada “**Reproducción de Palo Fierro (*Olneya tesota*) e interacción de Bacterias promotoras de crecimiento Vegetal en el Desierto de Altar, Sonora**”, realizada por la **M.C. Maricela Duarte Medina**; 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:

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Consejo Particular

Dr. EDGAR OMAR RUEDA PUENTE
DIRECTOR DE TESIS

DR. MANUEL CRUZ VILLEGAS
CO-DIRECTOR DE TESIS

Ph. D. LEONEL AVENDAÑO REYES
SINODAL

DR. JUAN FRANCISCO PONCE MEDINA
SINODAL

DR. BERNARDO MURILLO AMADOR
SINODAL

DEDICATORIA

Bendito Dios, gracias por darme la vida y por caminar siempre a mi lado. Gracias, por permitirme una vez más culminar una etapa tan importante en mi vida. Mil gracias Dios.

Al ser más maravillosos que tengo en mi vida, que asido como un ángel en mi camino, **mi hija Itzel Nicole**, quien con su sonrisa me alienta para seguir adelante y superar cada obstáculo que se presente.

Con mucho cariño a mis padres, gracias por su apoyo en todo momento. Dios los bendiga y los cuide siempre. A mis hermanas (o) gracias por estar a mi lado en todo momento, en especial a mi hermana Blanca, quien siempre me ha brindado su apoyo incondicional. Gracias a todos. Dios los bendiga siempre.

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 una servidora por parte de los doctores del ICA, Dr. Manuel Cruz Villegas y al Dr. Francisco Ponce Medina. A todos los maestros gracias por su apoyo.

A quien tanto me ha apoyado y siempre me ha orientado para lograr tantas metas en la vida. Mil gracias Dr. Edgar Omar Rueda P.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por brindarme la oportunidad mediante el otorgamiento de una beca para la realización de mis estudios de doctorado. Numero de beca CONACyT: 236485 y al proyecto 14651 de CONAFOR-CONACYT, que financió el presente estudio de investigación.

INDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Clasificación científica del Palo fierro (<i>Olneya tesota</i>).....	4
Distribución mundial.....	4
Usos dados al Palo fierro (<i>Olneya tesota</i>).....	6
Deforestación.....	7
Iniciativas de conservación.....	7
Importancia de la reforestación.....	8
Restauración Ecológica.....	9
Aprovechamiento de recursos maderables y no maderables.....	10
Normatividad.....	12
Fomento de actividades forestales.....	13
Bacterias promotoras del crecimiento de plantas (BPCP).....	15
Características microbiológicas de las PGPB.....	17
Microorganismos benéficos para el crecimiento y desarrollo de las plantas.....	18
Microorganismos fijadores de nitrógeno.....	18
Fijación de nitrógeno.....	19
Enlace, quimiotaxis y reconocimiento de las plantas por las PGPB.....	20
Métodos de aislamiento y caracterización de las PGPB.....	22
Identificación de bacterias.....	23

PGPB endófitas.....	24
Inoculación de plantas con PGPB.....	26
Interacción planta-bacteria: estructura y función de la raíz.....	28
Morfología de la raíz.....	29
Estructura de la raíz.....	30
Estructura primaria.....	30
Estructura secundaria.....	30
Cambium.....	30
Felógeno.....	30
La interface raíz-suelo.....	31
Interacción planta-bacteria: exudados radicales.....	31
Naturaleza cuantitativa y cualitativa de los exudados.....	33
Sitios de liberación de los exudados.....	33
Factores que afectan la exudación.....	34
Manipulación genética de las PGPB.....	36
Inoculantes bacterianos simples y mixtos, teorías y aplicaciones.....	36
Materiales de inoculación.....	38
Cualidades de los inoculantes comerciales.....	40
Polvos.....	40
Mezclas.....	40
Granulados.....	40
Líquidos.....	41

Co-inmovilización de microorganismos para el biotratamiento de aguas residuales.....	41
Aumento del crecimiento de microalgas por pgb.....	42
MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
Población microbiana colonizadora de rizosferas de plantas del desierto de Sonora Área de muestreo y colecta de muestras.....	43
Aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a rizósfera de Palo fierro Sonorense.....	44
Solubilización de fosfatos por bacterias aisladas de rizósfera de Palo fierro con alta capacidad de fijación de nitrógeno.....	46
Evaluación de <i>Rhodococcus fascians</i> en la germinación de Palo fierro (<i>Olneya tesota</i>) bajo diferentes salinidades <i>in vitro</i>	46
Colecta de semilla de <i>Olneya tesota</i>	46
Pruebas de germinación	47
Longitud radicular y altura de la plántula.....	48
Peso fresco de plántula de Palo fierro.....	48
Cuantificación de células bacterianas (Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) adheridas al sistema radicular de plantas de <i>Olneya tesota</i>	49
Evaluación de <i>Rhodococcus fascians</i> en la germinación de Palo fierro (<i>Olneya tesota</i>) bajo diferentes salinidades: estudio en invernadero.....	49
Longitud radicular de plántula y altura de planta.....	50
Peso fresco y peso seco de la plántula.....	51
Cuantificación de células bacterianas adheridas al sistema radicular de plantas de Palo fierro.....	51
Análisis bromatológicos.....	51

RESULTADOS	52
Aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno en la rizósfera de <i>Olneya tesota</i>	52
Determinación de la capacidad de fijación de N ₂ de las bacterias aisladas e Identificadas.....	52
Determinación de la capacidad de solubilizar fosfatos.....	53
Evaluación de inoculantes y NaCl en la germinación y crecimiento de plántulas de <i>Olneya tesota</i>	56
Porcentaje final de emergencia de <i>Olneya tesota</i> con la Inoculación de <i>R. fascians</i> y <i>A. halopraeferens</i> en condiciones de invernadero.....	57
Altura de plántula, Longitud radicular, Peso fresco y seco de plántula en Invernadero.....	61
DISCUSIONES	66
CONCLUSIONES	68
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ANEXOS	82
Plant growth promoting bacteria associated to palo fierro (<i>olneya tesota</i>) rhyzosphere in sonora desert (Universidad y Ciencia).....	83
Biofertilizantes en la agricultura orgánica (De Riego).....	86
Effect of the inoculation of rhodococcus fascians and azospirillum halopraeferens in germination of palo fierro (<i>olneya tesota gray</i>) under greenhouse conditions.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	Pág.
1	Mapa fisiográfico del desierto de Sonora, indicando los puntos de muestreo (arboles de <i>Olneya tesota</i>).....	44
2	Árbol filogenético de la secuencia del 16 rRNA, de la bacteria aislada (<i>Rhodococcus fascians</i>) de rizósfera de <i>Olneya tesota</i> del desierto de Sonora.....	53
3	Solubilización de fosfatos de <i>Rhodococcus fascians</i> , <i>Kocuria polaris</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y <i>Planococcus antarcticus</i> en medios de cultivo conteniendo fosfato de calcio insoluble. Barras representan ES (error estándar). Cuando el ES está ausente en las barras, el ES es más pequeño que el punto.....	54
4	Efecto de <i>R. fascians</i> y <i>A. halopraeferens</i> bajo cuatro concentraciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M) en plántulas de <i>Olneya tesota</i>	69

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	TÍTULO	Pág.
1	Factores que afectan al proceso de exudación de sustancias por la raíz.....	39
2	Medida de halos (mm) como producto de la solubilización de fosfatos de <i>Rhodococcus fascians</i> , <i>Kocuria polaris</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y <i>Planococcus antarcticus</i> , bajo concentraciones de salinidad y condiciones de temperatura. Literales iguales en valores medios indican valores no significativos con P= 0.05. Las comparaciones fueron desarrolladas dentro de las columnas usando la prueba de rango múltiple de Duncan's. Los valores representan la media de cinco repeticiones.....	55
3	Efectos de <i>Rhodococcus fascians</i> y <i>A. halopraeferens</i> en longitud radicular, altura de planta, peso fresco y peso seco de plántulas de <i>Olneya tesota</i> , bajo cuatro concentraciones de NaCl. Literales iguales en valores medios indican valores no significativos con P= 0.05. Las comparaciones fueron desarrolladas dentro de las columnas usando la prueba de rango múltiple de Duncan's. Los valores representan la media de cinco repeticiones. Bacteria ($1 \cdot 10^8$ CFU ml ⁻¹).....	58
4	Efecto de <i>Rhodococcus fascians</i> y <i>A. halopraeferens</i> en el contenido lipídico, proteína y cenizas en plántulas de <i>Olneya tesota</i> , bajo cuatro concentraciones de NaCl. Literales iguales en valores medios indican valores no significativos con P= 0.05. Las comparaciones fueron desarrolladas dentro de las columnas usando la prueba de rango múltiple de Duncan's. Los valores representan la media de cinco repeticiones. Bacteria ($1 \cdot 10^8$ CFU ml ⁻¹).....	60
5	Comportamiento de la emergencia de Palo fierro inoculado con <i>Azospirillum halopraeferens</i> y <i>Rhodococcus fascians</i> y su respectivo control sin inoculante en plántulas de Palo fierro (<i>Olneya tesota</i>), bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl) en condiciones de invernadero.....	63

6	Efecto de la inoculación de <i>Azospirillum halopraeferens</i> y <i>Rhodococcus fascians</i> y su respectivo control sin inocular en plántulas de Palo fierro (<i>Olneya tesota</i>), bajo condiciones de salinidad (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl) en condiciones de invernadero.....	64
7	Efecto de <i>Azospirillum halopraeferens</i> y <i>Rhodococcus fascians</i> en contenidos totales de lípidos, proteínas y cenizas en plantas de Palo fierro (<i>Olneya tesota</i>), bajo cuatro concentraciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl) en condiciones de invernadero.....	65

RESUMEN

En un tiempo relativamente corto, la vegetación de México ha sufrido extensas alteraciones. La huella de la deforestación, las quemadas de montes, el sobre-pastoreo y sus consecuencias sobre la vegetación y el suelo fértil están a la vista en casi cualquier paisaje del país. Ante la situación de graves consecuencias sobre la productividad del campo y la conservación de la biodiversidad, surge como una prioridad inaplazable el comenzar a desarrollar procedimientos para revertir este terrible deterioro de una manera inteligente.

Entre las especies vegetales más importantes desde el punto de vista cultural y ecológico en el Desierto Sonorense esta una leguminosa arborescente conocida como Palo fierro (*Olneya tesota*). Dicha especie se considera como un modificador clave para la estructura y función del ecosistema.

Para esta investigación, se propuso la utilización de palo fierro (*Olneya tesota*) 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, 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 e insecticidas. La utilización de BPCP, pueden ser utilizadas para reducir la fertilización química, ya que la fertilización química, incrementa la salinidad y daña el suelo, subsuelo y mantos acuíferos. En base a lo anterior, los objetivos de la presente investigación fueron: Aislar, purificar e identificar bacterias promotoras del crecimiento de plantas asociadas a rizósfera de Palo fierro Sonorense, así como cuantificar la actividad enzimática de la nitrogenasa responsable de la fijación de nitrógeno y solubilización de fosfatos en los aislados bacterianos, en diferentes salinidades y temperaturas; de igual forma, evaluar el efecto promotor del crecimiento de plantas de Palo fierro por medio de estas bacterias en experimentos de inoculación en semilla y desarrollo de plantas, en forma líquida *in vitro* e invernadero.

En este caso la restauración ecológica estuvo dirigida a tratar de recuperar las principales funciones ambientales del ecosistema original, que permitan mantener la estabilidad en la fertilidad, la conservación del suelo y el ciclo hidrológico, aunque parte de la diversidad se haya perdido, la estabilidad del sistema tenga que ser manejada.

Con la finalidad de considerar las características morfológicas y la abundancia de las bacterias en el sistema de raíz y suelo de *Olneya tesota* 17 colonias fueron seleccionadas. Estos 17 morfo-tipos estuvieron presentes en los cinco sitios de muestreo. Cuando se cultivaron en diferentes concentraciones de cloruro de sodio, las 17 colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas crecieron más rápido en 0,25 M de NaCl a los 30 y los 55°C. A esta concentración, el crecimiento suficiente de bacterias se produjo en 14 a 33 h, mientras que a 0, 0,5 y 0,75 M de NaCl, el crecimiento fue más lento teniendo en cuenta las dos temperaturas. Estos resultados indican la capacidad de las bacterias para crecer en un ambiente salino seco árido, que tiene 0,3 M de NaCl. Durante los ensayos de reducción de acetileno, sólo cuatro de las 17 especies aisladas mostraron una actividad significativa de reducción de acetileno, de las cuales, las bacterias fijadoras de nitrógeno que mostraron alta capacidad de reducción de acetileno fueron identificadas y los resultados mostraron la identidad con *Rhodococcus fascians*, *Kocuria polaris*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Planococcus antarcticus*, que están presentes en suelo y el agua, asociados con las plantas, y tienen una importante capacidad de fijación de nitrógeno.

Sin embargo, en la solubilización de fosfato entre las especies estudiadas, *Kocuria polaris*, mostró diferencias significativas en comparación con los otros géneros estudiados (*Rhodococcus fascians* y *Planococcus antarcticus* y *Bacillus amyloliquefaciens*), teniendo en cuenta la salinidad a 0, 0,25 y 0,75 M de NaCl a los 30 y 55°C (Cuadro 2). Lo contrario ocurrió en 0,5 M a 30°C en *Bacillus amyloliquefaciens* que mostró valores más altos, mientras que a 50°C fue *Planococcus antarcticus*.

Acorde a los resultados y debido a que *Olneya tesota* debe ser mejorada para la reforestación de zonas perturbadas y ser usado por las industrias de alimentos y productos agrícolas, es importante tener en cuenta las estrategias para su reproducción y cultivo. En este sentido, se pudo encontrar la presencia de microorganismos promotores del crecimiento vegetal asociados a las raíces de *O. tesota*.

Palabras claves: *Rhodococcus fascians*, *Olneya tesota*, fijación de nitrógeno.

ABSTRACT

In a relatively short time, the vegetation of Mexico has undergone extensive alterations. The footprint deforestation, burning of forests, overgrazing and their consequences on vegetation and fertile soil are visible in almost any landscape of the country. Given the situation with serious consequences on farm productivity and biodiversity conservation, emerges as an urgent priority to begin to develop procedures to reverse this terrible deterioration in a smart way.

Among the most important plant species from the standpoint of cultural and ecological in the Sonoran Desert is a leguminous tree known as Ironwood (*Olneya tesota*). This species is considered as a modifier key to ecosystem structure and function.

For this research, we proposed using ironwood (*Olneya tesota*) with the interaction of Bacteria Plant Growth Promoters (BPCP) rhizospheric microorganisms such as these are beneficial bacteria between some properties, can fix atmospheric nitrogen, synthesize phytohormones that build plants and can act as biocontrol pathogens to damage plants. Additionally, the plant to cause stress tolerance, such as drought, high salinity, toxic metals and insecticides. Using BPCP, can be used to reduce chemical fertilizer as chemical fertilization, salinity increases and damages the soil, subsoil and groundwater. Based on the above, the objectives of this research were to isolate, purify and identify growth-promoting bacteria associated plant rhizosphere Sonoran ironwood and quantify the activity of nitrogenase enzyme responsible for nitrogen fixation and solubilization phosphates in bacterial isolates in different salinities and temperatures, and likewise, to evaluate the effect of plant growth promoter ironwood by these bacteria inoculation experiments seed and plant development in vitro and liquid emissions.

In this case ecological restoration was aimed at trying to recover the main features of the original ecosystem environment that will maintain stability in fertility, soil conservation and the water cycle, although part of the diversity is lost, the stability of system has to be managed.

In order to consider the morphological and abundance of bacteria in the root system and soil *Olneya tesota* 17 colonies were selected. These 17 morpho-types were present at the five sampling sites. When cultured in different concentrations of sodium chloride, the 17 colonies selected nitrogen fixing bacteria grew faster in 0.25 M NaCl at 30 to 55°C. At this concentration, sufficient bacterial growth occurred in 14 to 33 h while at 0, 0.5 and 0.75 M NaCl, growth was slow considering the two temperatures. These results indicate the ability of bacteria to grow in a dry arid saline environment, which has 0.3 M NaCl for the acetylene reduction assays, only four of the 17 species showed significant activity isolated acetylene reduction of which, nitrogen-fixing bacteria that showed high acetylene reduction capacity were identified and the results showed identity with *Rhodococcus fascians*, *Kocuria polaris*, *Bacillus amyloquefaciens* and *Planococcus antarcticus*, which are present in soil and water, associated with plants, and have an important nitrogen fixing capacity.

However, solubilization of phosphate between the species studied, *Kocuria polaris* showed significant difference compared with other genera studied (*Rhodococcus fascians*, and *Bacillus amyloquefaciens* and *Planococcus antarcticus*), taking into account the salinity of 0, 0.25, and 0,75 M NaCl at 30 and 55°C (Table 2). The opposite occurred in 0.5 M at 30°C in *Bacillus amyloquefaciens* showed higher values, while at 50°C was *Planococcus antarcticus*.

According to the results and because *Olneya tesota* must be improved for reforestation of disturbed areas and be used by the food industry and agricultural products, it is important to consider strategies for breeding and cultivation. In this regard, it was found the presence of plant growth promoting microorganisms associated with the roots of *O. tesota*.

Keywords: *Rhodococcus fascians*, *Olneya tesota*, nitrogen fixation.

INTRODUCCIÓN

En un tiempo relativamente corto, la vegetación de México ha sufrido extensas alteraciones. Muy pocas áreas del territorio nacional contienen aún comunidades ecológicas inalteradas. La huella de la deforestación, las quemadas de montes, el sobre-pastoreo y sus consecuencias sobre la vegetación y el suelo fértil están a la vista en casi cualquier paisaje del país. Ante esta situación de tan graves consecuencias sobre la productividad del campo y la conservación de la biodiversidad, surge como una prioridad inaplazable el comenzar a desarrollar procedimientos para revertir este terrible deterioro de una manera inteligente.

Entre las especies vegetales más importantes desde el punto de vista cultural y ecológico en el Desierto Sonorense esta una leguminosa arborescente conocida como palo fierro (*Olneya tesota*). Dicha especie se considera como un modificador clave para la estructura y función del ecosistema, esto se debe a que su extrema longevidad lo convierte prácticamente en un elemento más del medio físico creando micro-hábitats que benefician a muchas especies tanto de flora como de fauna, por lo que se considera al palo fierro como una especie nodriza (CONABIO-CONANP. 2009; Nabhan y Plotkin, 1994).

Resulta irónico que una especie cuya importancia ecológica ha sido evidenciada repetidamente sea a la vez objeto de una intensa explotación. No solo para la fabricación de artesanías, sino para la producción de carbón vegetal, que frecuentemente usan madera de palo fierro extraída de forma ilegal. Aunado a ello, hay otros factores que representan una amenaza para dicha especie. La siembra de zacate buffel (*Cenchrus ciliaris*) ha ocasionado la remoción de la cubierta vegetal en extensas áreas del estado de Sonora, lo que ha afectado a las poblaciones de dicha especie, además tiene un efecto negativo en el ecosistema para la acumulación de materia seca que favorece los incendios. Se debe sumar además, la fragmentación y disminución del hábitat a consecuencia de la expansión de zonas urbanas. Desafortunadamente el riesgo de permanencia a largo plazo de *Olneya tesota* en ciertas áreas de su distribución se ve exacerbado si se considera que se trata de una especie de lento crecimiento y baja tasa de reclutamiento.

En México se ha designado al palo fierro como una especie con protección especial (NOM-059-ECOL-2001), Sin embargo, esto no parece suficiente para asegurar la permanencia de las poblaciones en estas áreas. Lo anterior se debe a que la extracción de madera de palo fierro y el efecto de la conversión del hábitat incluso ocurre al interior de las áreas protegidas. Además se ha observado en diversas investigaciones que las poblaciones localizadas en el Estado de Sonora presentan altos índices de daño por corte de la madera de palo fierro, incluso se observa una escasa presencia de individuos jóvenes.

La creciente demanda del sector forestal por incrementar las poblaciones de especies nativas de conservación y comercialización de alto valor económico, ecológico y ambiental, ha generado la creación de viveros donde la reproducción de palo fierro es mediante el método convencional que consiste en la aplicación de fertilizantes químicos, lo cual influye significativamente en el incremento de la salinidad en ambientes árido-salinos como lo es el noroeste de México. Bajo este contexto y conociendo que la propagación de este tipo de especies está basada fundamentalmente en semillas, se abordan múltiples estrategias para favorecer la eficacia de los procesos de emergencia de plantas jóvenes, dentro de las cuales se incluye el uso de microorganismos promotores de emergencia radicular y de crecimiento vegetal.

La inoculación con microorganismos del suelo benéficos es una práctica común en agricultura y silvicultura en países desarrollados (Bashan *et al.*, 2004). Dichos microorganismos, tales como bacterias promotoras de crecimiento en plantas y hongos micorrízicos, son parte integral de los procesos de revegetación y reforestación y pueden ser usados como una herramienta biotecnológica, ya que desarrollan actividades relacionadas con los procesos de descomposición y mineralización de complejos orgánicos y la traslocación de bioproductos y elementos minerales que conllevan la movilización de los nutrientes en el ecosistema suelo-planta (Reyes *et al.*, 2008).

Existe evidencia científica que ha establecido que el funcionamiento de un ecosistema terrestre depende de la actividad microbiana del suelo. Específicamente,

la calidad del suelo y la productividad vegetal derivan de múltiples reacciones de los microorganismos que llevan a cabo en la zona afectada por las raíces de las plantas. En efecto, los microorganismos protagonizan diversas acciones que producen beneficios a las plantas. Entre otras actividades, sintetizan fitohormonas que facilitan el enraizamiento, secretan compuestos que mejoran la estructura del suelo, facilitan la captación de nutrientes y protegen a la planta contra patógenos.

Con base a lo anterior, en la presente investigación se plantearon los siguientes objetivos: aislar, purificar e identificar bacterias promotoras del crecimiento de plantas asociadas a rizósfera de palo fierro Sonorense, así como cuantificar la actividad enzimática de la nitrogenasa responsable de la fijación de nitrógeno y solubilización de fosfatos en los aislados bacterianos, en diferentes salinidades y temperaturas; de igual forma, evaluar el efecto promotor del crecimiento de plantas de palo fierro por medio de estas bacterias en experimentos de inoculación en semilla y desarrollo de plantas, en forma líquida *in vitro* e invernadero.

REVISIÓN DE LITERATURA

Clasificación científica de palo fierro (*Olneya tesota*)

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Tribu: Faboideae

Género: *Olneya*

Especie: *Olneya tesota*

El palo fierro fue descrito en 1854 como la única leguminosa del género *Olneya* por el botánico estadounidense Asa Gray. Tiene apariencia de arbusto con varios troncos ramificados desde cerca del suelo o apariencia de árbol con no más de dos ramas y alcanza hasta 15 metros de alto. Su tronco tiene un diámetro de hasta 60 cm en individuos muy viejos. Las ramas jóvenes alcanzan de 10 a 15 mm de grueso, son verdes y parecen ser fotosintéticamente activas, las ramas más viejas desarrollan una capa gruesa de corteza externa (CONABIO-CONANP, 2009).

Tiene hojas alternas divididas (pinnadas) de 6 cm de largo, con 4 a 12 pares de folíolos angostamente elípticos, verde grisáceo y de 7 a 20 mm de largo. En la base de cada hoja tiene un par de pequeñas espinas curvadas (CONABIO-CONANP, 2009).

Sus flores son de color lavanda rosado de 12 mm de longitud y crecen agrupadas en cortos ramilletes densos que se forman en las axilas de las hojas al final de las ramas, en forma arqueada. El fruto de palo fierro es una vaina globosa de 3 a 6 cm de largo por 8 a 9 mm de ancho y con una a ocho semillas de 5 a 6 mm de diámetro que se abre al madurar. La emergencia de semillas inicia entre los 15 a 20 días de sembradas y el porcentaje de emergencia es de 85%.

Distribución mundial: es originario de los desiertos del suroeste de Estados Unidos y norte de México y se distribuye desde el sur de la parte desértica de California y

Arizona en Estados Unidos hasta las planicies y laderas secas de los Estados de Baja California y Sonora en México. Los límites de su distribución se asemejan mucho a los del Desierto de Sonora (Sañudo *et al.*, 2009).

Vive a lo largo de todo el Desierto de Sonora, pero varía grandemente en densidad y dominancia relativa entre las subdivisiones del desierto. En los Estados Unidos las densidades más altas se localizan en las tierras altas de Arizona en el Condado Pima, donde se calcularon un promedio de 35 árboles por ha. Se calcula que la densidad promedio de palo fierro en México, es mucho menor que en Estados Unidos, alcanzando densidades medias cercanas a 6.6 árboles por hectárea. Los datos de densidades de las poblaciones en México son escasos. Habita desde el nivel del mar hasta aproximadamente 900 m de elevación (Suzán *et al.*, 1997).

El follaje es semideciduo, pero algunos individuos en condiciones favorables lo mantienen siempre verde. Hacia el límite de su distribución, en tierras altas, el recambio de hojas comienza en junio y julio, al tiempo de un rápido desarrollo de frutos. Las ramas que producen muchos frutos suelen quedarse sin follaje (Turner, 1963).

Florece a principios de verano entre mayo y junio. Mientras muchos árboles individuales florecen cada año, la floración parece ser mayor solo dos años de cada cinco. En algunos casos hay eventos puntuales de floración en cuatro de cada diez años (Turner, 1963).

Los frutos se producen en verano y maduran en agosto. La maduración de las semillas coincide con las lluvias de verano incrementando la posibilidad de germinación. La maduración ocurre dentro de las cuatro a ocho semanas después de la polinización. La temperatura óptima para la germinación parece ser de 25 a 30°C y la mayor parte de las semillas frescas (80 a 90%) germinan sin tratamientos adicionales. Las plántulas emergen en 4 a 12 días y pueden alcanzar los 25 cm de alto en su primera estación (Turner, 1963).

El clima de la región donde habita es desértico muy árido (Clima BW) con precipitaciones de 75 a 400 mm por año y temperatura media anual mayor a 22°C.

En los meses de diciembre a febrero la temperatura puede ser de 8 °C y hasta de bajo cero, en julio y agosto puede llegar a los 49 °C (Turner, 1963).

Es un componente dominante y de gran importancia ecológica de muchas comunidades de plantas principalmente de bosque espinoso y matorral xerófilo. Crece en suelos arenosos y rocosos de las planicies y laderas. Frecuentemente se restringe a los cursos de agua del desierto donde la escorrentía de las tormentas incrementa la humedad disponible. Los individuos de mayor talla se encuentran en estos hábitats, algunas veces formando bosquecillos con otros árboles del desierto (Turner, 1963; Sañudo *et al.*, 2009).

La existencia de palo fierro tiene gran importancia ecológica ya que una gran diversidad de plantas perennes crece cerca o debajo de su copa. Se ha encontrado que entre 65 a más de 200 especies de plantas dependen de él para su sobrevivencia, en especial aquellas de corta vida y las anuales ya que crea un micro hábitat especial bajo su sombra. Se multiplica por semillas y se cultiva en cualquier suelo medianamente fértil y muy bien drenado, a pleno sol. Aunque tolera ligeras heladas. Este árbol crece silvestre en lechos desérticos, donde las raíces pueden alcanzar agua subterránea. Es una buena elección para jardines de zonas áridas. Crece muy lentamente, las plantas establecidas pueden crecer hasta 60 cm por año bajo condiciones favorables (Suzán *et al.*, 1997).

Usos de palo fierro (*Olneya tesota*)

El palo fierro obtiene su nombre de su pesado duramen. Es una de las especies de mayor importancia ecológica y económica en el Desierto de Sonora. Su principal producto es la madera, la que por su notable dureza utilizan algunas comunidades indígenas del norte de México para la manufactura de artesanías. Los mayos, yaquis, pápagos y seris la han utilizado tradicionalmente en la elaboración de utensilios, instrumentos musicales, postes para cercas, horcones para sostener las viviendas, en la producción de carbón y en la fabricación de puntas de arpones de pesca, figuras de animales. Las flores son utilizadas para preparar una infusión contra males del estómago y riñones. Sus semillas se emplean para elaborar pan,

tortillas y atole, y poseen una calidad de proteína y aceite que les da potencial comercial comparable al de la soya, el girasol o el cártamo. La oxidación del aceite es lenta lo cual favorece su almacenamiento durante períodos mayores que incluso el del aceite del maíz (Romeu, 1996).

Deforestación

Debido a la pronta popularidad de las figuras de madera, a su gran demanda y a la falta de programas de manejo, el palo fierro llegó casi a su extinción, por lo que sólo pudo aprovecharse en un período que abarcó de los sesenta hasta mediados de los setenta. Se considera que el consumo de esta especie para producción de carbón, artesanía y forraje en los Estados de Sonora y Baja California ha afectado la salud de sus poblaciones y comunidades asociadas. Cerca de la Reserva de la Biósfera del Pinacate la extracción ilegal de madera de Palo fierro no ha cesado, afectando claramente a las plantas raras que se asocian a esta especie (CONABIO-CONANP, 2009).

Iniciativas de conservación

Durante 1995 la Asociación Mexicana de Arte y Cultura Popular A.C. llevó a cabo el proyecto "Conservación del Palo fierro de Sonora y Uso Integral de Maderas Duras Tropicales de Quintana Roo" con el objetivo de evaluar una posible solución a la destrucción del palo fierro sustituyendo su uso por maderas duras tropicales de textura similar. Uno de los logros del proyecto fue el Registro de Marca Colectiva para el Arte Seri, con la Dirección General de Normas del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial para todas las ramas de producción artesanal incluyendo la talla, lo cual permitirá apoyarles en una estrategia de comercialización en galerías, tiendas especializadas, museos e instituciones de apoyo. Por su parte, en Estados Unidos se estableció el Monumento Nacional del bosque de palo fierro en el 2000 por el presidente William Clinton de los Estados Unidos de Norte América (CONABIO-CONANP, 2009).

Importancia de la reforestación

La desertificación es un fenómeno creciente en todo el mundo la reducción de tierras cultivables y el aumento de los riesgos de salud debido a la contaminación por polvo. La reforestación es una de las soluciones comunes para combatir la desertificación de los desiertos, los árboles destinados a la reforestación inicialmente se cultiva en invernadero o viveros y más tarde son trasplantado al campo (Bashan *et al.*, 2009).

A pesar de que en la gran mayoría de las superficies muy alteradas no lograremos ya recuperar lo que antes existía, es aún posible inducir el desarrollo de una vegetación protectora que permita conservar e incrementar la fertilidad del suelo y parte de la diversidad de plantas y animales (Vázquez *et al.*, 2009).

Un recurso fundamental para lograr lo anterior lo constituyen las especies vegetales herbáceas y leñosas nativas que tengan la potencialidad de crecer en zonas profundamente alteradas y que con el tiempo, permitan la recuperación de la fertilidad del suelo, un microclima y un ciclo hidrológico similares a los originales y el restablecimiento de al menos parte de la flora y fauna nativa que aún sobrevive en algunos sitios (Vázquez *et al.*, 2009).

Hasta nuestros días, los programas de reforestación desarrollados por los gobiernos estatales, el ejército y las dependencias del gobierno federal han hecho uso principalmente de especies de árboles exóticos mundialmente conocidos y algunas especies nativas biológicamente mal conocidas, lo que ha impedido que se tenga algún éxito en los propósitos anteriormente mencionados. Los bosques de especies exóticas se transforman por lo general en “desiertos verdes” que no permiten la subsistencia de la gran mayoría de las especies locales de plantas y animales. Cuando estos son cultivados en pendientes, cumplen muy pobremente su pretendida función de proteger el suelo de la erosión y ayudar a restaurar el ciclo hidrológico original (Vázquez *et al.*, 2009).

En contraste, varias especies de árboles y arbustos de los géneros *Caesalpinia*, *Enterolobium*, *Gliricidia*, *Guazuma*, *Leucaena* presentes en México han

sido empleados para reforestación, restauración y agroforestería en otros continentes como África.

Cuando se reforesta con especies exóticas se tienen resueltos los problemas de domesticación y disponibilidad de propágulos; sin embargo, los resultados obtenidos con éstas, obligan a replantear la necesidad de domesticar y aprender a propagar especies nativas, para lo cual es necesario realizar un inventario de las especies que presenten las propiedades biológicas y ecológicas más adecuadas para cada clima y condición ambiental del país (Vázquez *et al.*, 2009).

Para hacer un uso exitoso de las especies nativas de cada región en programas de restauración ecológica y reforestación, es indispensable profundizar el conocimiento sobre la biología, la ecología, la propagación y el manejo de las especies disponibles, a fin de posibilitar la domesticación de dichas especies y desarrollar técnicas eficientes de propagación, e incluso llegar a mejorar por selección sexual, clonal o ingeniería genética algunas de sus características más valiosas. Es importante también tomar en consideración la utilidad de las especies para la población local, ya que ello redundará en una mejor conservación de las zonas restauradas (Vázquez *et al.*, 2009).

Restauración Ecológica.

Existen tres posiciones diferentes con respecto al significado de la restauración ecológica. Una visión fundamentalista de ésta, consiste en considerar la restauración como un regreso a las condiciones existentes en las comunidades naturales originales de cada región, incluida la diversidad biológica original incluso logrando nuevamente cierta estabilidad sin necesidad de manejo posterior. El retorno a la situación original puede aún ser posible en zonas perturbadas de lugares como reservas de la naturaleza en las que sólo una parte de la comunidad original ha sido alterada; en cambio, en muchos sitios sólo será posible aplicar una segunda opción más práctica y que puede combinarse con actividades productivas.

En este caso la restauración ecológica estaría dirigida a tratar de recuperar las principales funciones ambientales del ecosistema original, que permitan mantener la

estabilidad en la fertilidad, la conservación del suelo y el ciclo hidrológico, aunque parte de la diversidad se haya perdido, la estabilidad del sistema tenga que ser manejada y algunas especies extrañas previamente inexistentes hayan ingresado al área.

Los niveles de destrucción de la cubierta vegetal, del suelo fértil y de la capacidad de regeneración de la vegetación nativa marcarán la pauta del origen y las características biológicas de las especies que podrán usarse para cada localidad. Lugares con un nivel de deterioro relativamente leve podrían conservar los mecanismos naturales de regeneración o cicatrización como la presencia de un banco edáfico de semillas y estructuras vegetativas vivas, lluvia de semillas y un suelo aún fértil. Un nivel de deterioro mayor podría requerir de manipulaciones que incluyen el mejoramiento ambiental del sitio mediante el uso de especies de plantas mejoradoras, de las cualidades del suelo y del microclima, combinada con la reactivación de la lluvia de semillas procedentes de zonas conservadas cercanas a través de medios biológicos (Vázquez *et al.*, 2009).

Aprovechamiento de recursos maderables y no maderables

Desde el punto de vista comercial, cuando se habla de bosques o selvas, se tiende a incluir sólo a los árboles y la madera que se extrae de ellos, a estos recursos se le denomina como recursos forestales maderables. Sin embargo, existen especies de los estratos arbustivos y herbáceos con significado cultural e importancia ecológica, comúnmente conocidas como recursos forestales no maderable (Angulo *et al.*, 2005). Ambos recursos se definen como los bienes de origen biológico por generar madera, la leña y el carbón vegetal; así como, los servicios ambientales brindados por los ecosistemas (Enríquez *et al.*, 2003).

Dichos recursos constituyen un potencial importante como fuente de ingresos y empleo para las comunidades rurales. Además, son fuente de alimentos, medicinas y otros productos para el autoconsumo de la población. En México se utilizan alrededor de 1,000 productos entre los no maderables y los maderables, los cuales se obtienen de un gran número de especies distribuidas en los diferentes

ecosistemas presentes en el territorio nacional. Se han identificado aproximadamente 10,000 taxa de plantas útiles y 240 especies de hongos, cifras conservadoras si se considera que en México existen alrededor de 30,000 especies de fanerógamas y de 120,000 a 140,000 especies de hongos (Rzedowski, 1983).

Los recursos maderables y no maderables más comunes dentro del mercado son aproximadamente 70, mismos que representan una producción promedio anual de 68,000 ton, aunque esta cifra sólo considera aquellos productos que están sujetos a un control oficial, ya que existe un volumen muy grande que se comercializa sin regulación o se destina al autoconsumo. En general existe poca información sistematizada sobre su cuantía, valor, manejo, conservación, comercialización e industrialización. Lo anterior, aunado a la temporalidad y variabilidad de su producción y mercados, generan un vacío de información que poco favorece a su conservación y al desarrollo de sus mercados (Olivas y Rivera, 1984).

La recolección de productos forestales no maderables y maderables de clima árido y semiárido se distribuye en el altiplano mexicano, e incluye a los estados de Querétaro, Guanajuato, Aguascalientes, Zacatecas, San Luis Potosí, Durango, Chihuahua, Nuevo León, Coahuila, así como Sonora y la Península de Baja California (Becerra, 2000).

La producción en menor escala se concentra en los Estados de Oaxaca, Puebla, Hidalgo, Estado de México y Tamaulipas. Se estima que toda el área de distribución cubre una superficie de 58.5 millones de ha, mismas que representan el 30% del territorio nacional (Rzedowski, 1983).

En 1995 los recursos maderables y no maderables de clima árido y semiárido ocuparon el segundo lugar en producción no maderable con 13,342 ton (29%) y una derrama económica estimada en 24 millones de pesos (32% del total nacional). La participación de estos productos dentro del total de PFNM se ha reducido notablemente en los últimos 5 años, ya que la contribución en 1999 fue tan sólo del 23 %. Gran parte del problema se atribuye a la enorme cantidad de sustitutos (principalmente sintéticos) que han reducido notablemente tanto la demanda como el

precio de la mayoría de estos recursos (maderables y no maderables) de estas regiones (Olivas y Rivera, 1984).

Durante el año 2005, la producción forestal no maderable total registrada fue de 359,347 ton, en ella sobresalen las fibras 3,299 ton, ceras 2,894 ton, rizomas 17 ton, y el rubro de otros con 53,817 ton integrado por los siguientes productos: hojas, frutos, semillas, tallos, corteza, tintes, esencias y aceites, plantas, pencas, maguey, sotol, hongos, nopal, musgo, heno, etc. (SEMARNAT, 2005).

Normatividad

La Ley General de Desarrollo Forestal Sustentable incluye en sus objetivos “el regular y fomentar el manejo y aprovechamiento de los ecosistemas forestales del país y sus recursos, así como su conservación, protección y restauración”. El artículo 53 del Reglamento de la Ley General de Desarrollo Forestal Sustentable hace referencia al aviso para el aprovechamiento de los recursos forestales que se deberá presentar ante la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, mediante el formato que contenga el nombre, denominación o razón social y domicilio del propietario o poseedor del predio o conjunto de predios y en su caso número de oficio de la autorización en materia de impacto ambiental (SEMARNAT, 1997).

Las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) que regulan el aprovechamiento de los principales productos no maderables, actualmente la mayoría de ellas en revisión o bien en vías de iniciar dicho proceso, establecen que las notificaciones de aprovechamiento deberán contener: I. Título que acredite el derecho legal de propiedad o posesión respecto del terreno o terrenos objeto de la notificación o, en su caso, el documento que acredite el derecho para realizar actividades de aprovechamiento; II. Nombre y número de inscripción del responsable técnico en el Registro Forestal Nacional; III. Nombre y ubicación del predio, incluyendo un plano o croquis de localización; IV. Superficie, especies y cantidad estimada en toneladas por aprovechar anualmente, incluyendo sus nombres comunes y científicos; V. Descripción de los criterios para la determinación de la madurez de cosecha y reproductiva, así como las técnicas de aprovechamiento de cada especie, dentro del

marco de los criterios y especificaciones que se establecen en la Norma correspondiente VI. La definición y justificación del periodo de recuperación al que quedarán sujetas las áreas intervenidas, de acuerdo a las características de reproducción y desarrollo de las especies bajo aprovechamiento; VII. Medidas de protección a las especies de fauna silvestre; VIII. Medidas de protección a las especies de flora y fauna silvestres con estatus; IX. Medidas para prevenir y controlar incendios, plagas y enfermedades forestales y otros agentes de contingencia; y X. Medidas de prevención y mitigación de impactos ambientales negativos que pudiera ocasionar el aprovechamiento, durante sus distintas etapas de ejecución, así como en caso de suspensión o terminación anticipada (SEMARNAT, 1996; 1997).

Fomento de actividades forestales

Con base en el artículo 60 de la Ley de Desarrollo Rural Sustentable el Gobierno tiene la obligación de promover que se cuente con el capital necesario para la realización de actividades productivas y de servicios del sector rural, para lo cual establece Programas Sectoriales que constituyen instrumentos y mecanismos financieros que fomenten la inversión de los sectores público, privado y social. Asimismo los artículos 30 en el que se establece que la política nacional en materia forestal deberá promover el fomento y la adecuada planeación de un desarrollo forestal sustentable y, el 34 que cita como criterios obligatorios de política forestal de carácter económico los referentes al fomento del desarrollo constante y diversificado de la industria forestal; la integración de cadenas productivas y comerciales; así como de la investigación, el desarrollo y transferencia tecnológica en materia forestal, entre otros (CONACUBIO, 2007).

La Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), a través de la Comisión Nacional Forestal (CONAFOR), desarrolla y promueve actividades productivas, de protección, conservación y restauración en materia forestal. Con esta finalidad ha creado mecanismos de apoyo para impulsar el desarrollo forestal sustentable, como Programas Especiales, proárbol y el Programa de Desarrollo Forestal Comunitario (PROCYMAF II) (Enríquez *et al.*, 2003).

Los subsidios para la conservación y restauración de los ecosistemas forestales están destinados a realizar prácticas de preservación, protección, cuidado, manejo y mantenimiento de los ecosistemas, los hábitats, las poblaciones y las especies; así como para obras y acciones de rehabilitación que permitan controlar los procesos de degradación, para que se recuperen y mantengan parcial o totalmente el suelo, la dinámica hidrológica, la estructura vegetal y la biodiversidad asegurando la productividad. Lo anterior permitirá asegurar la productividad de los ecosistemas forestales, dentro o fuera de sus entornos naturales, de manera que salvaguarden las condiciones naturales para su permanencia a largo plazo; el ámbito de acción incluye a cuerpos de agua dulce, salada o salobre, ya sean permanentes o temporales (Becerra, 2000).

Los productores tienen la opción de financiamiento mediante los Programas Especiales de la CONAFOR, para la ejecución de actividades inmediatas que propicien la conservación y regeneración natural de especies incluidas en la NOM-059-SEMARNAT-2001, con alguna categoría de riesgo, que sean de distribución restringida o bien su hábitat esté disminuyendo; cuando se trate de especies sobre-explotadas o que carecen de manejo forestal, se recolecten para uso doméstico o artesanal, o bien sean de interés biotecnológico y científico (CONACUBIO, 2007).

El principal programa de apoyo al sector forestal de la actual administración federal es el denominado proárbol, el cual reúne en una sola convocatoria los recursos económicos que otorga la CONAFOR e integra el eje fundamental de las actividades de la institución en torno al objetivo de impulsar el desarrollo forestal, prioritariamente en los municipios identificados por la Secretaría de Desarrollo Social como los de mayor índice de marginación en México (Carrillo y Mota, 2006).

El PROCYMAF II, otorga apoyos económicos directos a ejidos y comunidades que cumplan con criterios de elegibilidad para que realicen actividades que fortalezcan su planeación y organización social; estudios de asistencia técnica, talleres y cursos de capacitación para mejorar el aprovechamiento de sus recursos forestales; realización de estudios de factibilidad para la definición e instrumentación de proyectos de inversión con base en el uso de sus recursos. También se financian

actividades complementarias de difusión y promoción; formación de técnicos forestales comunitarios; así como el fortalecimiento de los servicios técnicos y profesionales que son contratados por los ejidos y comunidades (CONABIO, 2007).

Además de los programas gubernamentales del sector forestal, existen algunas instituciones cuyo objetivo es el fomento a la productividad en el campo como el Fondo de Capitalización e Inversión del Sector Rural (FOCIR), Nacional Financiera (NAFINSA), Fideicomiso de Riesgo Compartido (FIRCO), Programa de Apoyos Directos al Campo (PROCAMPO), Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA), Fondo Nacional de Apoyo para las Empresas de Solidaridad (FONAES) y Financiera Rural (Carrillo y Mota, 2006).

Bacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPB)

El término de bacterias promotoras del crecimiento vegetal PGPB (plant growth promoting bacterial) fue acuñado por Joe Kloepper en 1980, en la universidad de Auburn de Estados Unidos de América, haciendo referencia a un grupo de microorganismos benéficos para el desarrollo de las plantas los cuales se pueden encontrar o no asociadas a diversos tejidos vegetales (Tenuta, 2004). 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; Peña y Reyes, 2007).

Varios grupos de microorganismos del suelo como *Azotobacter* sp, *Azospirillum* sp, *Klebsiella* sp, *Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp, *Enterobacter* sp, son consideradas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) (Kloepper, 1983; Glick y Bashan, 1997; Bloemberg, 2007). Se han encontrado y caracterizado microorganismos como *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* como potenciales PGPB gracias a que poseen un metabolismo versátil y la capacidad de utilizar diversos sustratos liberados por la planta para su desarrollo. Adicionalmente poseen tiempos cortos de germinación, alta movilidad, fijación biológica de nitrógeno, capacidad para colonizar las raíces y producción de metabolitos secundarios que

pueden regular el crecimiento vegetal y regular las poblaciones microbianas rizósfericas (Kapulnik, 2002; Villegas *et al.*, 2010).

Para ser consideradas PGPB, 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 Levanony, 1987).

Las bacterias promotoras del crecimiento de plantas, en las dos últimas décadas, han sido objeto de estudio con un alto grado de interés. En años recientes se ha despertado cierta controversia con este grupo, ya que no se sabe hasta qué punto se puede considerar a una rizobacteria como una bacteria promotora de crecimiento, por lo que se han establecido cuatro características generales que definen este grupo:

- Que no requieran de la invasión interna de tejidos en plantas, como ocurre en hongos micorrízicos con la formación de nódulos o arbusculos en el caso de *Rhizobium*.
- Que tengan una elevada densidad poblacional en la rizósfera después de su inoculación, ya que una población que declina rápidamente tiene una baja capacidad competitiva con la microflora nativa del suelo.
- Que presenten capacidad de colonización efectiva en la superficie de la raíz y como consecuencia puedan influir positivamente en el crecimiento de la planta.
- Que no produzcan daño en el hombre ni a otros microorganismos (Bashan y Holguin, 1998).

En cuanto al efecto positivo sobre el crecimiento por las plantas, las PGPB pueden actuar de manera directa o indirecta:

Mecanismos indirectos: los metabolitos producidos de las PGPB pueden funcionar como determinantes antagónicos, involucran aspectos de control biológico, suprimen o inhiben el crecimiento de microorganismos perjudiciales para el desarrollo de la planta, vía de producción de sideróforos, antibióticos, acción de enzimas líticas (gluconasa, quitinazas) o inducción de mecanismos de resistencia.

Mecanismos directos: ocurren cuando los metabolitos producidos por algunas cepas de las bacterias son utilizados como reguladores de crecimiento o precursores de estos por parte de la planta.

La conjunción de ambos mecanismos de acción ha dado como resultado la promoción evidente del crecimiento de plantas; se ha observado un incremento en la emergencia, el vigor y el peso de plántulas, un mayor desarrollo en sistemas radiculares y un incremento hasta de 30% en la producción de algunos cultivos de interés comercial (Glick y Bashan, 1997; Rueda *et al.*, 2005).

Características microbiológicas de las PGPB

Las bacterias son las unidades básicas de vida de las plantas; son organismos unicelulares que pueden vivir como autótrofos o como heterótrofos y a provechar el alimento soluble. Varían en tamaño de 0.5 a 5µm y tienen características básicas. Su reproducción es por fisión binaria y en el tiempo de regeneración en algunas especies puede tomar sólo 20 min. En condiciones favorables. Algunas bacterias forman esporas resistentes que pueden permanecer por períodos prolongados en condiciones ambientales hostiles pero que pueden reactivarse al retornar las condiciones favorables. La mayoría de las bacterias se desarrolla en pH más o menos neutro, aunque algunas especies pueden existir en un ambiente altamente ácido. Las bacterias desempeñan una función vital en los procesos naturales de estabilización y se utilizan ampliamente en el tratamiento de aguas residuales orgánicas (Tebbutt, 2001). Se conoce un gran número de este tipo de microorganismos, las cuales son bacterias de vida libre o asociativas que fijan N₂,

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).

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.

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 producen 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 (López, 1992; Frioni, 1999; Atlas y Bartha, 2002).

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 las que se encuentran 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).

Existen 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 hospedera (Mayz, 2004; Pelczar y Chan, 1981).

La fijación biológica de N_2 constituye un aspecto clave de la sostenibilidad y producción de alimentos respetuosa con el medio ambiente, así como la productividad de los cultivos a largo plazo. La fijación simbiótica del N_2 atmosférico por las leguminosas es el único proceso biológico que puede suministrar cantidades suficientes de N a los sistemas agrícolas para mantener los correctos niveles de N en el suelo y aportar el N demandado por las plantas.

El proceso de fijación se encuentra influenciado por parámetros abióticos tales como el contenido en N inorgánico en el suelo, la disponibilidad de agua en el suelo o la temperatura del mismo. Además, otros factores bióticos como el genotipo, las

tasas de germinación o la intensidad de defoliación van a ser de decisiva importancia. El manejo eficiente de la leguminosa con el objetivo de maximizar sus beneficios depende de una correcta valoración en campo de la fijación de N₂ (Benítez, 2006).

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 la incorporación de este elemento debido a organismos libres 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).

Enlace, quimiotaxis y reconocimiento de las plantas por las PGPB

La quimiotaxis bacteriana es el proceso de atracción/repulsión mediante el cual la bacteria se desplaza hacia concentraciones óptimas de un atrayente o bien, en contra de un repelente que se encuentra en los exudados radicales de las plantas. La quimiotaxis es la migración de los microorganismos bajo la influencia de un gradiente químico, es el caso de respuesta de comportamiento bacteriano mejor estudiado donde la bacteria navega a los nichos más óptimos para su crecimiento y supervivencia (Zhulin y Armitage, 1992; Alexandre y Zhulin, 2001).

En la quimiotaxis, las bacterias tienen una atracción general hacia atrayentes químicos no específicos encontrados en exudados de raíces por los cuales muchas rizobacterias migran. El desplazamiento de las bacterias es un proceso activo y una consecuencia es que la quimiotaxis bacteriana está influenciada por el balance entre

los exudados atrayentes y repelentes de las raíces. A medida que el microorganismo capta concentraciones elevadas de la sustancia quimiotáctica, éste se desplaza hacia el gradiente de concentración de dicha sustancia (Madigan *et al.*, 1997).

El proceso por el cual las bacterias se mueven hacia la raíz y la colonizan, no es muy claro. No obstante, se han propuesto algunos factores que favorecen este proceso, como: mayor disponibilidad de carbono, condiciones favorables de humedad, tiempo de generación y quimiotaxis, aerotaxis, adhesión y la capacidad de movimiento. La quimiotaxis puede ser una respuesta a sustratos específicos y no específicos de la raíz, así como gradientes de dióxido de carbono. *Azospirillum*, por ejemplo, se mueve hacia zonas con bajo oxígeno disuelto y diversas sustancias químicas. Si la cantidad de sustrato producido por los exudados de la raíz de la planta es significativamente grande, los organismos capaces de usar este sustrato obtendrán una ventaja competitiva. Una vez que el crecimiento microbiano activo comienza alrededor de la raíz, es común que las sustancias que ellos requieren se metabolicen. En ese momento, la importancia de la quimiotaxis puede ser baja (Osti *et al.*, 2004).

El movimiento de las bacterias aerobias, como *Azospirillum* y *E. coli*, es una respuesta a un gradiente de oxígeno. *Azospirillum* forma una banda nítida en un gradiente de oxígeno (de 3 a 5 μM); las bacterias se mueven hacia donde existen esos niveles y son repelidas por concentraciones más bajas o más altas. La concentración de oxígeno preferida para la aerotaxis de *Azospirillum* y *E. coli* es similar a la concentración que favorece la fijación biológica de nitrógeno. En ese sentido, la aerotaxis representa una respuesta ambiental adaptativa importante, que puede guiar a las bacterias diazotróficas de vida libre, a las condiciones óptimas para la fijación de nitrógeno en la rizósfera (Osti *et al.*, 2004).

¿Es el reconocimiento un atributo esencial requerido para una asociación planta-bacteria? Cuando las bacterias inoculadas están en estrecha proximidad con la superficie de la planta, surgen preguntas relacionadas con la presencia de mecanismos bacterianos para el reconocimiento de un huésped adecuado, o un mecanismo de la planta para reconocer a una bacteria adecuada. Si el

reconocimiento está involucrado, entonces ha sido establecida alguna forma de contacto específico entre la molécula liberada por la bacteria y el receptor correspondiente de la planta huésped. Este contacto podría ocurrir de manera extracelular como un evento temprano dentro de la asociación planta-bacteria, o podría ocurrir posteriormente, a nivel inter o intra celular. Además, el resultado del reconocimiento puede ser positivo, redundando en el exitoso establecimiento de la asociación planta-bacteria o negativo culminando en respuestas de la planta tales como hipersensibilidad (Rueda *et al.*, 2009).

La presencia de un proceso de reconocimiento explicaría por qué solo algunas bacterias selectas del suelo, o del entorno de la rizósfera o la filósfera, pueden beneficiar a la planta, y otras no (Rueda *et al.*, 2009).

Métodos de aislamiento y caracterización de las PGPB

Existen diferentes métodos de aislamiento de bacterias benéficas en estrecha relación con los nichos ecológicos más frecuentes. Los lugares más factibles para hacer los aislamientos son el suelo rizosférico, la superficie y los tejidos de la raíz. Entre las técnicas más utilizadas para estos fines, en la actualidad se encuentran los métodos convencionales (aislamiento directo del suelo o la raíz sin tener en cuenta las interacciones que se establecen entre las plantas y los microorganismos). El modelo espermosférico y el modelo microcosmos (Hernández *et al.*, 2006).

El modelo espermosférico facilita el crecimiento de las plantas en condiciones axénicas simulando las condiciones existentes en la naturaleza a través de la utilización de un medio de cultivo semisólido que contienen microelementos, que se encuentran presentes en la rizósfera, y libre de fuente de carbono y nitrógeno. En el mismo, sólo se desarrollarán los microorganismos con la capacidad de utilizar los exudados liberados por la planta como fuente nativa para los procesos de crecimiento y actividades metabólicas microbianas (Hernández *et al.*, 2006). El empleo del mismo aumenta la probabilidad de conocer la verdadera posición y estructura de la actividad microbiana asociada con las raíces de las plantas estudiadas, además de favorecer el aislamiento de nuevos tipos de bacterias. Por

otra parte, el modelo microcosmos está formado por un columna con suelo rizosférico en la cual se siembra una semilla previamente desinfectada y germinada, con el objetivo de favorecer la quimioatracción de las bacterias por los exudados radicales liberados por el cultivo, permitiendo aislar a los microorganismos de interés teniendo en cuenta la interacción planta-bacteria (Kabir y Faure, 1996).

Estos métodos poseen grandes ventajas con relación a los métodos tradicionales pues se aproxima más a las condiciones reales de la vida de los microorganismos en la rizósfera y permite aislar a los géneros que predominan en la rizósfera de los cultivos de interés. Para la caracterización de las comunidades microbianas presentes en la rizósfera, tradicionalmente se han usado técnicas convencionales, las cuales son útiles a pesar del tiempo que requieren para ser utilizadas. En este sentido han surgido otros métodos de identificación de alta sensibilidad y confiabilidad, tal es el caso de las técnicas serológicas y las de biología molecular (Goddard *et al.*, 2001).

Identificación de bacterias.

El proceso de identificación se conoce como la ubicación de una bacteria desconocida, con base a su similaridad, en un grupo taxonómico previamente descrito. Los microbiólogos necesitan identificar, en alguna de las etapas de su investigación, la bacteria con la cual se encuentran trabajando. Antes de que una bacteria pueda ser identificada es necesario que esta se encuentre creciendo en un cultivo puro, y debe de ser probada en un medio no selectivo. Otro de los prerequisites es que las condiciones en las que se realice la identificación sean bien definidas, de otra manera ésta resulta sin significado alguno.

Las bacterias son inicialmente identificadas con base a sus características morfológicas y a sus reacciones bioquímicas. En adición algunos grupos de bacterias pueden ser identificadas con pruebas serológicas y/o de susceptibilidad a bacteriófagos. Métodos más sofisticados tales como determinación de los rangos de bases de ADN, gel electroforesis de proteínas celulares, análisis de la pared celular, cromatografía de gases e hibridación de ADN, se encuentran disponibles.

Debido a la gran diversidad de bacterias la práctica normal es realizar una serie preliminar de pruebas las cuales puedan dirigirnos hacia un grupo bacteriano apropiado. Las pruebas básicas determinan si las bacterias son fototróficas, quimiotótrofas, heterótrofas o bien utilizan carbohidratos por oxidación o fermentación. Estas características junto con otras como: forma y tamaño de la célula, reacciones de Gram, movilidad, requerimiento de oxígeno, producción de endosporas, reacciones de oxidasas y catalasas, formación de cápsulas y presencia o ausencia de cuerpos de inclusión, pueden indicar un esquema adecuado de identificación (Pickup y Saunders, 1990; Prosser, 1994).

PGPB endofíticas

Las bacterias endofíticas, son microorganismos que viven dentro de los tejidos de las plantas sin ocasionar daños. Estas bacterias pueden ser aisladas de la superficie desinfectada de tejidos vegetales o extraída de los tejidos internos de plantas. En las relaciones endofíticas, las PGPB realmente residen dentro de los espacios intracelulares o bien en el interior de las células de la planta huésped (An *et al.*, 2001). Son un grupo específico de microorganismos (bacterias, actinomicetos y hongos) que pueden encontrarse en diferentes tipos de tejidos vegetales incluyendo los de semillas, frutos, hojas, tubérculos, tallos, etc. Estos presentan una ocurrencia alta en los cultivos de importancia agrícola y alta relevancia en sus sistemas de producción (Surette y Sturtz, 2003; Dibut *et al.*, 2005).

Las bacterias endofíticas tienen la ventaja sobre las bacterias rizosféricas, de la gran cantidad de nutrientes de que disponen, así como de la protección que les brinda la planta de las condiciones adversas del medio. Además, por encontrarse en contacto íntimo con la planta, podrían brindar beneficios más directos a su hospedero en comparación con las bacterias rizosféricas (Rodríguez *et al.*, 2005).

Este tipo de bacterias han mostrado actividad promotora de crecimiento vegetal en diferentes cultivos de importancia económica como papa, arroz y tomate. Diversos aislamientos son capaces de inducir resistencias frente a estrés tanto biótico como abiótico en las plantas inoculadas, también se ha demostrado que las

comunidades de endófitos disminuyen el desarrollo de enfermedades y en algunas instancias la relación planta-endófito ha mostrado especificidad por el tipo de tejido de colonización (Surette y Sturtz, 2003).

Gran parte de los estudios de bacterias endófitas se han encaminado a describir su relación con las raíces de las plantas y sus efectos sobre la promoción de crecimiento vegetal, dejando a un lado la relación de los endófitos con semillas y su posible acción sobre su germinación y emergencia. Aunque las bacterias que promueven el crecimiento son frecuentemente inoculadas sobre semillas, no se conoce si dicho microorganismo puede desarrollarse en sincronía con la planta y colonizar tejidos aéreos o radicales, por lo que se ha planteado en muchas ocasiones la reinoculación de este organismo después del desarrollo vegetal (Surette y Sturtz, 2003).

Los sitios endofíticos incluyen todas las regiones internas de la planta. Los microorganismos endófitos, por lo general, se encuentran dentro de los espacios intracelulares o apoplásticos. Los espacios intracelulares comprenden una parte importante del tejido dentro de las raíces y las hojas. Por ejemplo, los espacios entre las células corticales de la raíz pueden ser hasta un 30% del volumen de la raíz, y los que existen entre las células del mesófilo de la hoja pueden ser de hasta un 70% del volumen de la hoja. Los microorganismos que llegan a estas regiones intercelulares deben soportar la respuesta de defensa vegetal, que se activan cuando las bacterias se encuentran próximas a las células vegetales. Las bacterias en estos sitios endofíticos pueden tener acceso al agua y a los nutrientes más fácilmente que en la superficie, especialmente si las células vegetales se lisan causando fuga de nutrientes, como ocurre dentro de la patogénesis. De igual forma, dentro de la planta las bacterias pueden obtener protección frente a las fluctuaciones del medio ambiente característicos de la filósfera y obtener ventaja frente a la intensa competencia por los nutrientes característicos de la rizósfera (Beattie, 2006).

Inoculación de plantas con PGPB

La inoculación de las plantas con bacterias benéficas se remonta desde hace siglos. Por experiencia, los agricultores sabían que cuando el suelo mixto es tomado de un cultivo de leguminosas anteriores con el suelo en el que se sembrara nuevamente, los rendimientos suelen mejorar. A finales del siglo XIX, la práctica de mezclar "naturalmente inoculado" el suelo con las semillas se convirtió en un método recomendado de la inoculación de leguminosas en los EE.UU. (Smith, 1992). Una década más tarde, la primera patente ("Nitragin") fue registrado para la inoculación de plantas con *Rhizobium sp.* Finalmente la práctica de la inoculación con *Rhizobium* se hizo común (Bashan, 1998).

Durante casi 100 años, inoculantes de *Rhizobium* se han producido en todo el mundo, principalmente por las pequeñas empresas. Algunas leguminosas como la soya (*Glycine max* (Merr.) L.) en Brasil, no son fertilizados con nitrógeno, solo son inoculados. Además de la inoculación de soya, que ha tenido un impacto importante en la agricultura de EE.UU., Brasil y Argentina, importantes contribuciones a la producción de otras leguminosas se realizaron en Australia, Norteamérica, Europa del Este, Egipto, Israel, Sudáfrica, Nueva Zelanda, y en menor medida, el sudeste asiático (Bashan, 1998).

Dos grandes avances en la tecnología de la planta de la inoculación se produjo a finales de 1970: (i) *Azospirillum* fue encontrado para mejorar el crecimiento de plantas que no son leguminosas, afectando directamente el metabolismo de la planta (Bashan y Holguín, 1997), y (ii) los agentes de control biológico, principalmente de *Pseudomonas fluorescens* y grupos de *P. putida*, comenzaron a ser intensamente investigadas. En los últimos años, varios otros géneros bacterianos, tales como *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Acetobacter*, *Azospirillum* y varios microorganismos asociados también han sido evaluados (Bashan, 1998).

La respuesta inmediata a la inoculación del suelo con asociativas, PGPB no simbióticas (pero también para *Rizobios*) varía considerablemente dependiendo de las bacterias, las especies de plantas, tipo de suelo, la densidad de inoculo y las condiciones ambientales. En general, poco después de que las bacterias se

introducen en el suelo, la población bacteriana disminuye progresivamente. Este fenómeno, junto con la producción de biomasa bacteriana y el estado fisiológico de las bacterias en el inoculante, pueden prevenir la acumulación de una población suficientemente grande de PGPB en la rizósfera de obtener la respuesta de la planta prevista (Bashan, 1998).

El principal obstáculo es que el suelo es heterogéneo e imprevisible al medio ambiente, incluso en pequeña escala. Las bacterias inoculadas a veces no pueden encontrar un nicho vacío en el suelo para la supervivencia, excepto en el suelo esterilizado, una condición que no existe en gran escala en la agricultura. Tienen que competir con microflora nativa mejor adaptada y resistir la depredación de protozoos. Una función importante de la formulación del inoculante es proporcionar un microambiente más adecuado (aunque sea temporalmente) para evitar la rápida disminución de bacterias que se introducen en el suelo. Aunque se sabe mucho sobre la supervivencia de las bacterias en el entorno de protección de una compañía de inoculantes, poco se sabe acerca de las tensiones que las bacterias deben soportar por traslado a la competencia y a veces duro de medio ambiente del suelo (Heijnen *et al.*, 1992; Rodríguez-Navarro *et al.*, 1991; Van Alsacia y Heijnen, 1990). Los inoculantes tienen que ser diseñados para proporcionar una fuente confiable de bacterias beneficiosas que sobrevivirán en el suelo y estarán disponibles para la planta.

La inoculación del trigo (*Triticum aestivum* L.) con bacterias benéficas que estimulen el crecimiento vegetal y/o biocontrolan patógenos, ha sido informada por varios autores. Así, se han encontrado efectos positivos al inocular este cultivo con bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckii*, *Pseudomonas* y otros, lográndose en todos los casos incrementos en los pesos seco y fresco de la parte aérea, la altura de las plantas y del rendimiento y sus componentes (Hernandez *et al.*, 2002).

Interacción planta-bacteria: estructura y función de la raíz

La arquitectura radicular de una planta, referida comúnmente como “la mitad oculta”, está compuesta por un órgano subterráneo de forma lineal con patrones de arquitectura y crecimiento muy complejos, estando el sistema radicular en sí definido principalmente por el tipo de planta, la estructura del suelo y las interacciones entre los dos. Mientras que la forma de las hojas y otros órganos pueden ser interpretados como adaptaciones a un ambiente o condiciones ambientales, esta situación no es paralela a lo ocurrido en las partes subterráneas de las plantas. En el ambiente de la raíz son muy pocas las variaciones significativas encontradas, y por ello, la carencia de variaciones importantes en los rasgos externos o morfológicos de las raíces. Sin embargo, se ha registrado una cierta plasticidad fenotípica, pues el ambiente, aunque macroscópicamente homogéneo, es micro heterogéneo, pero lo suficiente para ser detectado por la raíz durante su crecimiento, tanto en el tiempo como en el espacio, y es gracias a esta plasticidad la que le ha permitido al sistema radicular desarrollar raíces fibrosas llamados “cabellos radiculares”, cuya función primordial ha sido asociado al anclaje de la planta con el medio suelo. Además de esta función, las raíces también poseen otras, no tan obvias, que le confieren una importancia vital para la supervivencia y ecología de la planta, por ser además un sitio con una alta actividad fisiológica, dando origen a la síntesis, acumulación y liberación de compuestos, que interfieren en los patrones poblacionales intra e inter especie (Gilroy y Jones, 2000; Barlow, 2003).

La transferencia de los nutrientes desde el suelo hacia la planta es producida a través de una secuencia de varios procesos. Principalmente, las plantas absorben agua y nutrientes. La absorción de agua provee el transporte de nutrientes a través del flujo de masas desde el suelo hacia las raíces. La absorción de nutrientes tiende a vaciar la solución del suelo cerca de las raíces, creando un gradiente de concentración desde el suelo hacia la raíz y disturbando el equilibrio entre los iones disueltos en la solución del suelo y aquellos absorbidos en la fase sólida del suelo. Estos procesos causan tanto el transporte del nutriente desde el suelo a la raíz como

la desorción desde el material sólido del suelo que repleta la solución del suelo (Jungk, 2001).

Morfología de la raíz

La raíz como órgano de las plantas vasculares, generalmente crece hacia el interior del suelo, por tener geotropismo positivo y fototropismo negativo. La raíz y el tallo son los ejes de las plantas y entre ellos no existe una clara separación ya que ambos tienen un cilindro de tejido vascular incluido en el tejido fundamental; sin embargo, la estructura de la raíz es más simple que la del tallo debido a su hábitat subterráneo.

Las características de la diferenciación del tallo son: la ausencia de clorofila, yemas, nudos y entrenudos; sin embargo, hay excepciones, como las raíces adventicias del maíz que sí llegan a formar pequeñas cantidades de clorofila y raíces que poseen yemas adventicias como el camote, manzana y algunos rosales.

Sus funciones principales son la de absorción de agua y sales minerales (savia bruta) del suelo por medio de los pelos absorbentes hasta la raíz, donde son conducidos hacia el tallo y hojas a través del xilema, para ser transformados en compuestos orgánicos durante la fotosíntesis. Además las raíces fijan las plantas al suelo por medio de resistencia al doblar. Ciertas raíces de plantas pueden realizar funciones de almacén de alimentos, camote, zanahoria, jícama, remolacha, etc.

En una raíz con crecimiento primario se pueden distinguir:

- Cofia, caliptra o pilorriza.
- Zona apical.
- Zona meristemática o de división celular.
- Zona de alargamiento o de elongación celular.
- Zona de maduración o diferenciación celular.
- Zona pilífera o de los pelos absorbentes (también llamados pelos radicales).
- Zona suberificada.
- Zona de ramificaciones.
- Cuello.

De acuerdo a la forma que adquiere un sistema radical desarrollado y adulto, se distinguen dos tipos: sistema homorrítico (también llamado sistema fasciculado o en cabellera), sistema alorrítico (también llamado axonomorfo o pivotante) (Jana y Pinochete, 2004).

Estructura de la raíz

Estructura primaria: Es propia del crecimiento primario o sea, del primer año de vida de una planta y es diferente según donde se analice, en un corte a la altura de los pelos absorbentes distinguimos las siguientes partes de afuera hacia adentro:

- Rizodermis.
- Parénquima cortical.
- Endodermis: con bandas de caspary y células de paso.
- Periciclo.
- Floema.
- Xilema.
- Médula. A veces la médula no existe y es reemplazada por un gran vaso central, por unos pocos vasos grandes del metaxilema o por un hueco denominado cavidad medular.

Estructura secundaria: ocurre sólo en plantas leñosas de más de un año de vida y en gimnospermas y dicotiledóneas. Algunas dicotiledóneas herbáceas también pueden presentar crecimiento secundario, aunque más débil. En las monocotiledóneas si ocurre es anómalo. El crecimiento secundario de la raíz (así como también el del tallo) ocurre por la actividad de dos meristemas laterales.

Cambium: se ubica en el cilindro central separando los cordones de floema y de xilema y originando nuevas capas de floema hacia el exterior y de xilema hacia el interior. Esta actividad hace que la raíz crezca en grosor.

Felógeno: se ubica en la corteza como un cilindro, originando súber hacia el exterior y algunas capas de felodermis hacia el interior. El conjunto de súber, felógeno y

felodermis constituye la peridermis que reemplazará a la exodermis en sus funciones de protección.

La interface raíz-suelo

La interface raíz-suelo, conocida como rizósfera, así como la interacción que ocurre entre sus tres componentes (suelo, planta y microorganismos asociados) ha sido objeto de una extensa investigación, donde se ha podido establecer parte de las diferencias físicas, químicas y biológicas que ocurren entre la rizósfera y el suelo no rizosférico (Jana y Pinochete, 2004).

Interacción planta - bacteria: exudados radicales

Se denominan exudados radicales a los compuestos químicos secretados en el suelo por las raíces de las plantas, los cuales pueden cumplir importantes roles como atrayentes y repelentes químicos en la rizósfera (estrecha zona de suelo que rodea inmediatamente el sistema radical) (Walker *et al.*, 2003). Aunque la definición más común de exudado radical se refiere a los compuestos orgánicos liberados al medio circundante por raíces de plantas sanas e intactas (Sharma *et al.*, 2003), algunos autores distinguen entre exudados y secreciones, siendo los exudados aquellos compuestos liberados pasivamente y las secreciones aquellos compuestos liberados activamente. Las cadenas alimenticias en la rizósfera son altamente influenciadas por los organismos y los factores edáficos presentes, son complejos intercambios que se desarrollan alrededor de las raíces de la planta mediada por diferentes señales reguladoras que se encuentran en el exudado radicular, pero las señales también son producidas por los organismos que actúan recíprocamente (Broughton *et al.*, 2000). Estas interacciones involucran el tráfico de la señal entre las raíces y microbios del suelo (Hirsch *et al.*, 2003).

Sin embargo, no se ha realizado un estudio sistemático para determinar la complejidad y composición química en diversas especies de plantas. Se cree que los compuestos de bajo peso molecular, comprenden la mayor parte de los exudados radicales, estos incluyen aminoácidos, ácidos orgánicos, fenoles, y varios otros metabolitos secundarios, mientras que los exudados de alto peso molecular, incluyen

los mucílagos (polisacáridos de alto peso molecular) y las proteínas (Dakora y Phillips, 2002; Bais *et al.*, 2002; Walker *et al.*, 2003; Sullivan, 2004).

El sistema radicular en conjunto posee, de manera diferencial una resaltante habilidad para secretar compuestos con una gran diversidad de propiedades físicas y químicas a la rizósfera, como una respuesta al estrés o fluctuaciones de tipo tanto bióticas como abióticas donde estas se encuentran, definiéndose como rizósfera a los gradientes longitudinales y radiales donde ocurre la expansión de las raíces durante su crecimiento, adquisición de agua, nutrientes, exudación y subsiguiente crecimiento microbial, localizada desde la superficie de la raíz hasta 2 mm de distancia de esta, siendo la zona del suelo que más sufre los efectos producidos por los compuestos liberados por la raíz. Sin embargo, esta distancia no es absoluta, siendo dependiente de las propiedades del suelo, como lo es el tamaño de partícula, contenido de agua y la capacidad reguladora del pH. Otras definiciones más especializadas surgen de las actividades que ha sido posibles registrar en esta zona, donde el concepto de volumen de suelo que está influenciado por la actividad propia del sistema de raíz de la planta, suele ser la definición más específica y concertada. A partir de este concepto de rizósfera, se define el fenómeno de rizodeposición, referida como la liberación de toda forma de carbono a partir de las raíces. Los productos de la rizodeposición pueden ser categorizados como exudados, secreciones y grasas. La diferencia existente entre exudados y secreción, es que para el exudado, los compuestos son pasivamente liberados, mientras que en la secreción lo son activamente. En las secreciones se incluyen a los carbohidratos poliméricos y enzimas (Xu, 2000; Mcculley, 2001; Oliveros *et al.*, 2009). Los exudados incluyen compuestos de peso molecular altos, como mucílago, un material gelatinoso en la superficie de las raíces y dentro de los compuestos de bajo peso molecular, se encuentran ácidos orgánicos, azúcar, fenólicos simples, aminoácidos, flavonoides e incluso vitaminas, y son éstos los de mayor interés al momento de evaluar las transmisión de información al medio por parte de las plantas (Tu *et al.*, 2004; Rives *et al.*, 2007).

Naturaleza cuantitativa y cualitativa de los exudados

La especie, edad de la planta, estado fisiológico y grado de lignificación del aparato radical son características que afectan decisivamente a la composición cualitativa y cuantitativa de los exudados radicales, por lo tanto son factores que influyen en la magnitud del efecto rizósfera. El tipo de proteína o de carbohidratos exudados por las herbáceas depende de la edad de la planta. Los cambios en la exudación con la edad también se han detectado en leñosas, observándose que las plantas exudan una mayor cantidad de carbohidratos (cuantitativa y cualitativamente hablando), mientras que en las plantas adultas exudan más aminoácidos, amidas y ácidos orgánicos. La humedad del suelo influye cualitativa y cuantitativamente en la exudación radical, el estrés hídrico es uno de los factores que inducen la exudación radical. En las gramíneas, la composición cuantitativa y cualitativa de los microorganismos en la rizósfera varía entre especies e incluso entre genotipos de la misma especie, lo cual se atribuye principalmente a las variaciones intrínsecas de cada planta en particular, en términos de la cantidad y calidad de los exudados radicales (Rengel, 1997).

Sitios de liberación de los exudados

Las raíces primarias, secundarias y sus cabellos radiculares, genéricamente son capaces de liberar cantidades significativas de exudados. El proceso en sí depende en forma general de la especie de planta, presencia de microbios, estatus nutricional y agua de la planta, disponibilidad de oxígeno, medio de desarrollo y otras condiciones de crecimiento. Como se señaló, las raíces exudan una variedad importante de compuestos de donde se incluyen azúcares y polisacáridos simples (tales como arabinosa, fructuosa, glucosa, maltosa, manosa y oligosacáridos), aminoácidos (tales como arginina, cisteína y glutamina), ácidos orgánicos (tales como ácido acético, ascórbico, benzoico, ferúlico y málico) y compuestos fenólicos, muchos de los cuales poseen actividades y funciones demostradas (Oliveros *et al.*, 2009).

Rol de los exudados radicales y mecanismos de liberación. Se sabe que a través de la exudación de una amplia variedad de metabolitos secundarios, las raíces pueden regular la comunidad microbiana del suelo en su vecindad inmediata, manejarse con los herbívoros, estimular simbiosis benéficas, cambiar las propiedades químicas y físicas del suelo e inhibir el crecimiento de especies de plantas competidoras (Vivanco y Bais, 2004).

Un número amplio de microorganismos se encuentran en el suelo. La diversidad y el número de los mismos dependen en gran medida de la composición y concentración de los nutrientes exudados por las raíces de las plantas (Wamberg *et al.*, 2003).

Pocos han sido los estudios encaminados a identificar los microorganismos atraídos por los exudados radicales en especies de flor de corte, la mayoría de los reportes relacionados con estos estudios han sido realizados en gramíneas, fundamentalmente en cereales y los microorganismos encontrados en dichos cultivos difieren a partir de la zona geográfica, tipo de suelo y cultivo, entre otros aspectos (Soroa *et al.*, 2009).

Las PGPB en general son colonizadoras altamente agresivas por lo cual suelen desplazar microorganismos o especies deletéreas de la microflora de la raíz desencadenando con ello un descenso de las poblaciones de hongos y bacterias rizosféricas. Una bacteria altamente competitiva tiene un rápido crecimiento, es móvil y presenta quimiotaxis por los exudados radicales. Solamente del 8 al 20% de la superficie de las raíces es colonizada por las bacterias, siendo las zonas de mayor exudación las que presentan mayor colonización (Kapulnik, 2002).

Factores que afectan la exudación

Debido a la importancia que tienen los compuestos en los exudados, se ha señalado que el estudio de la actividad de exudación por una planta, el tipo y destino de los aleloquímicos en el suelo, los cambios que estos provocan sobre la biología y características físicas de la rizósfera, y su absorción por organismos receptores. También se ha señalado que los mecanismos que operan en la planta para lograr

una traslocación efectiva al medio de estos aleloquímicos es la exudación por raíz, pues es la que involucra tejido vivo, actividades fisiológicas y funciones importantes para el establecimiento de la planta. Desde el punto de vista de las interacciones planta-planta, la idea generalmente aceptada es la interacción directa de un compuesto liberado por una especie de planta donadora *A*, el cual causa un efecto sobre una planta receptora *B*. Sin embargo, siendo el suelo el soporte de las plantas, y zona de tránsito del aleloquímico, éste debe de interaccionar con esta zona durante su tránsito, y dependiendo del tipo de interacción, el aleloquímico, o lo que resulte de esa interacción, logrará una respuesta biológica a la planta codificada como receptora (Oliveros *et al.*, 2009).

Es evidente que las especies químicas liberadas y sus concentraciones relativas, son variables fundamentales que determinarán el grado de afectación que estos puedan causar, con lo cual, convierte a los diferentes factores que afectan a la capacidad de exudación por raíz de compuestos químicos, elementos claves en el estudio de la ecología de las interacciones planta-planta. En el Cuadro 1 se muestran los diferentes factores que pueden modificar los niveles y tipo de compuestos en los exudados de raíz. Entre otros, la planta misma, así como factores de tipo ambientales, son lo que más afectan el potencial de exudación por la raíz. Según la naturaleza de la planta, se encuentra que la composición y cantidad de compuestos exudados por raíz, dependen marcadamente de la fenología de la planta. Por ejemplo, en el maíz, la cantidad total de compuestos liberados por gramo de peso seco de raíz, disminuyen con el desarrollo de la planta. Se ha estimado que estos cambios son una consecuencia de alteraciones en el balance de carbohidratos, aminoácidos y aminos, mientras que el balance de otros compuestos constitutivos, no afectan esta cantidad de compuestos liberados, como lo es el caso de los ácidos orgánicos.

1. Muchos estudios han sido conducidos para entender esta diferencia en la exudación entre plantas jóvenes y adultas, donde se ha demostrado que ciertos rasgos o características fisiológicas, como la capacidad de distribución de carbono asimilado por raíz hacia el tallo, es un factor

fundamental. Sobre esto, se ha observado que la asimilación de carbono desde el medio de crecimiento en plantas jóvenes es trasladado a la raíz, mientras que en plantas adultas, el mismo es trasladado de manera preferencial al tallo, con lo cual, la distribución de carbono entre los diferentes órganos de la planta influirá también en los compuestos orgánicos exudados. Por lo tanto, es importante determinar la acumulación de carbono en la raíz y el tallo, o la acumulación de algunos compuestos en particular, para poder determinar rasgos adaptativos, como el crecimiento de raíz en condiciones de estrés y la dinámica de liberación de compuestos orgánicos desde la raíz, pues estos afectan de manera decisiva la biomasa microbiana, ciclo de nutrientes y descomposición de materia orgánica. Es decir, describir el comportamiento de los compuestos liberados por la raíz y su importancia para las funciones adaptativas que éstos puedan tener en la planta, debe de incluir el comportamiento durante el desarrollo de la planta (Oliveros *et al.*, 2009).

Manipulación genética de las PGPB

Uno de los paradigmas más grandes en la microbiología es la concepción de la existencia de las bacterias como organismos asociales, cuya única actividad era dividirse para generar una nueva bacteria, cada una, idéntica a la otra, sin embargo, desde hace más de 60 años se ha sugerido que lejos de esta conducta aislada, puede existir una conducta bacteriana en grupo, la cual sigue la norma “la unión hace la fuerza”. Pero si las bacterias realmente pueden tener una conducta en grupo, entonces se hace necesaria la existencia de un sistema de comunicación entre ellas.

Inoculantes bacterianos simples y mixtos, teorías y aplicaciones

Los inoculantes microbianos son el resultado de la formulación de uno o más microorganismos benéficos en un material de soporte de fácil manejo y material económico, tanto orgánicos, inorgánicos, o sintetizados a partir de moléculas

definidas económico. La formulación de los inoculantes dentro de sus múltiples aplicaciones, mejora procesos como la toma de nutrientes y promoción de desarrollo vegetal (Bashan, 1998). El inoculante es el medio de transporte bacteriano de la fábrica a la planta viva. El efecto deseado del inóculo en el crecimiento de plantas puede incluir la fijación de nitrógeno en leguminosas, control biológico de suelo (principalmente) las enfermedades transmitidas por el aumento de la absorción de minerales, la erosión de los minerales del suelo y nutritivo o los efectos hormonales (Rodríguez *et al.*, 2006).

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 de su aplicación, es esencial un sustrato que mantenga las características originales del inóculo el mayor tiempo posible (Bashan, 1998).

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 que deben ser capaces de liberar el número adecuado de células viables en buenas condiciones fisiológicas en el momento de la inoculación (Fages, 1992; Smith, 1992).

Características deseables para un buen inoculante: (i) características físicas y química. Los inoculantes deben ser casi estéril o fácilmente esterilizados, química y físicamente uniformes. También deben ser de calidad constante, de alta capacidad de retención de agua y adecuado para el mayor número las especies y cepas bacterianas como sea posible.

(ii) Las cualidades de fabricación. El inoculante debe ser fácilmente fabricado y mezclado por existentes de la industria, que debería permitir la adición de nutrientes, con un pH fácilmente ajustable y ser de una materia prima a un precio razonable en el suministro adecuado. (iii) Calidad de manejo agrícola. Un buen inoculante permite la facilidad de manejo, proporciona una liberación rápida y controlada de las bacterias en el suelo, se puede aplicar con máquinas aerotécnica. (iv) Las

características ambientales. El inoculante debe ser no tóxico, biodegradable, no contaminantes y deben reducir al mínimo los riesgos ambientales tales como la dispersión de las células a la atmósfera o al agua subterránea. (v) Las cualidades de almacenamiento. El inoculante debe tener la vida útil suficiente (uno o dos años a temperatura ambiente, a menudo es necesario para una buena integración en el sistema de distribución agrícola en algunos países) naturalmente, ningún portador solo puede tener todas estas calidades, pero uno bueno debería tener tantos como sea posible. Un "super-inoculant" como el que descrito encima es teóricamente posible (Bashan, 1998).

Las mezclas de la inoculación de microorganismos de control biológico son más eficaces en el control de patógenos que el uso de una sola cepa inoculante, por ejemplo, la combinación de *Pseudomonas* con *Serratia* y *Pseudomonas* con un patógeno *Fusarium* (Frommel *et al.*, 1991).

Materiales de inoculación

Existen diferentes sustratos que son utilizados como soportes para inoculantes, entre estos se encuentran cuatro categorías básicas:

- Los suelos: turba, suelos inorgánicos, arcillas, barro.
- Materiales de desecho de plantas: compost, estiércol, aceite de soya o maní y salvado de trigo.
- Materiales inertes: vermiculita, perlita, sulfato de calcio, geles de poliacrilamida y perlas de alginato.
- Liofilizados: estas preparaciones pueden ser incorporadas dentro de un soporte sólido o aplicado directamente al sustrato de siembra (Jackson *et al.*, 1991).

Dentro de los soportes más comúnmente utilizados está la turba, que es un material de origen vegetal; constituye la primera etapa de transformación de un vegetal a un mineral (carbón), posee gran porcentaje de materia orgánica y diversos nutrientes, permite una mayor aireación y mejor distribución de la humedad del suelo. Es muy utilizada para todo tipo de cultivos y también resulta excelente como base de

inoculantes: se ha utilizado con *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium sp* y *Pseudomonas fluorescens* entre otros (Bashan, 1998).

Cuadro 1. Factores que afectan al proceso de exudación de sustancias por la raíz.

Variable	Factores de la planta
Especies y variedades	considerable variación entre especies, tanto cualitativas como cuantitativas. Mayores variaciones observadas en ácidos orgánicos simples y aminoácidos. Aleloquímicos como ácidos hidroxámicos y momilactona.
Fenología	altos niveles de concentración en estados tempranos de desarrollo (germinación y plántulas). Rasgos característicos en plantas exudando ácidos fenólicos y hidroxámico
Factores ambientales	
Condiciones de cultivo	condiciones de cultivo afecta la exudación (ejemplo hidropónico vs. soporte sólido de vidrio). Aumento con la impedancia mecánica. Se supone daños en la superficie de la raíz durante su crecimiento aumentando su exudación.
Nutrientes	variable que más afecta los niveles de exudados, aumentando con el suministro de N, P y K, aunque algunas deficiencias minerales pueden aumentar el exudado de algunos compuestos, como el aumento de ácidos fenólicos en exudados con la deficiencia de Fe.
pH	efecto difícil de predecir por lo dinámico de los procesos en la raíz-suelo. El trigo se observa un aumento en los exudados con disminución del pH (de 6,4 a 5,9). Los mismos exudados pueden modificar el pH de la rizósfera.

El transportista es el vehículo de entrega de los microorganismos en vivo desde la fábrica hasta el campo, sin embargo, ninguna compañía universal o

formulación se encuentra actualmente disponible para la liberación de los microorganismos en el suelo (Trevors *et al.*, 1992). El transportista es la parte más importante (por volumen o peso) de los inoculantes.

Esperan que formulaciones microbianas inoculante emparejen las susodichas características y venzan dos problemas principales para organismos vivos: (i) pérdida de viabilidad durante el almacenaje corto en el depósito del cultivador (que en países en vía de desarrollo por lo general carecen de la refrigeración), y (ii) duración larga y estabilidad sobre la gama de -5 a 30 °C dentro de la t él comercializando sistemas de distribución. Los productos que carecen de esta gama de tolerancia de temperaturas serán inaceptables en el mercado agrícola (Bashan, 1998).

Cualidades de los inoculantes comerciales

- Un buen inoculante permite la facilidad de manejo (una de las principales preocupaciones para el agricultor), proporciona una rápida liberación controlada de bacterias en el suelo.
- El inoculante debe tener suficiente periodo de vida (uno o dos años).
- Larga vida útil y la estabilidad rango de tolerancia de temperatura de 30 °C dentro de la comercialización para sistemas de distribución.

Los inoculantes microbianos se espera que tengan características que superen los problemas importantes para los organismos vivos.

Los inoculantes vienen en cuatro formas básicas de dispersión:

Polvos. Esta formulación se utiliza principalmente como recubrimiento de semillas, en donde el inoculante se adhiere a las mismas; el tamaño estándar de las partículas varía de 0.075 a 0.25 mm, y la cantidad de inoculante usado está alrededor de 200 a 300 kg/ha. Estos inoculantes son los más comunes en países desarrollados.

Mezclas. Este inoculante se basa en polvo de tipo suspendido en inoculantes líquidos (por lo general agua). La suspensión es aplicada directamente al surco o bien bañan las semillas solamente (justo) antes de la siembra.

Granulados. Estos inoculantes son aplicados directamente al surco junto con las semillas. El tamaño va de 0.35 a 1.18 mm, un ejemplo son los inoculantes con *Rhizobium* que es utilizado en una dosis de 5 a 30 kg/ha. Estos inoculantes son populares y satisfactoriamente han sido comercializados desde 1975. Formas parecidas a una cuenta son las variaciones sintéticas de formas granulares. Estos pueden estar en tamaños macro (1 a 3 mm en el diámetro) usados como la forma de gránulos, o en el tamaño micro (100 a 200 μ m) usados como un polvo para la capa de semilla. Estos inoculantes son unos nuevos, aún improbados, la posibilidad en la tecnología de inoculación.

Líquidos. Estos inoculantes son preparados en agua, en mineral o aceites orgánicos. Las semillas pueden ser sumergidas en el inoculante antes de la siembra, o un aplicador uniformemente rocía el inoculante líquido sobre las semillas. Después del secado, las semillas son sembradas. Este método asegura aún la cobertura de las semillas sin la interferencia con el sistema de supervisión de semilla de los plantadores. Estos inoculantes son actualmente populares en los EE.UU., Canadá, Argentina, y Brasil, principalmente para la soya, pero también para lentejas, guisantes, y cacahuetes. Para los agentes biocontrol de enfermedades de hoja, el inoculante puede ser diluido en agua y rociado para mejor cobertura de las hojas. O bien, la suspensión puede ser rociada directamente en el surco o sobre las semillas antes de la siembra. En el surco el inoculante proporciona una cantidad más grande de bacterias a la planta que la inoculación de semilla. En *Rhizobio*, esto mejora la nodulación de la planta. Para bacterias con supervivencia pobre en el suelo, como *Azospirillum sp.* (Bashan *et al.*, 1995), estas formulaciones son en gran parte inútiles ya que ellos no proporcionan un ambiente de protección para la bacteria. Además, en alguna especie de planta, estas formulaciones deberían ser aplicadas varios días después de la siembra en la germinación de plantón (Bashan, 1998; Geola, 2003).

Co-inmovilización de microorganismos para el biotratamiento de aguas residuales

En ambientes acuáticos naturales o artificiales, marinos o de agua dulce, las microalgas están siempre asociadas a bacterias. Sin embargo, no se sabe si tales

bacterias son asociativas, promotoras de crecimiento, simbioses o simplemente coexisten con la microalga (como los saprofitos en ambientes terrestres). Aparte de unas pocas, tales bacterias han sido raramente aisladas o caracterizadas y su efecto en las microalgas, algunas utilizadas para el tratamiento de aguas residuales, es desconocido; sin embargo, se cree que muchas de estas bacterias son promotoras de crecimiento en plantas. Como las microalgas pueden ser consideradas plantas aunque unicelulares, estas bacterias promotoras de crecimiento podrían aumentar su crecimiento y su actividad metabólica. En tal sentido, el uso de *Azospirillum* una PGPB de origen agrícola, está a la vanguardia en este tipo de estudios (De-Bashan y Bashan, 2003).

Aumento del crecimiento de microalgas por PGPB

Para asegurar una estrecha proximidad física entre las microalgas y las bacterias, los dos microorganismos necesitan estar inmovilizados en una matriz transparente que debe cumplir con ciertos requisitos: permitir la entrada de luz necesaria para que las microalgas lleven a cabo sus procesos fotosintéticos y ser suficientemente pequeña para permitir la difusión de oxígeno y nutrientes dentro de la esfera. Al mismo tiempo, deberá ser suficientemente grande y pesada para evitar la flotación y asegurar completo sumergimiento en el medio de crecimiento (De-Bashan y Bashan, 2003).

MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología desarrollada en la presente investigación consistió en tres fases: Aislar, purificar e identificar bacterias promotoras del crecimiento de plantas asociadas a rizósfera del palo fierro Sonorense; cuantificar la actividad enzimática de la nitrogenasa responsable de la fijación de nitrógeno y solubilización de fosfatos en los aislados bacterianos, en diferentes salinidades y temperaturas y evaluar el efecto promotor del crecimiento de plantas de palo fierro, por medio de estas bacterias en experimentos de inoculación en semilla y desarrollo de plantas en forma líquida en condiciones de invernadero.

Población microbiana colonizadora de rizósfera de plantas del desierto de Sonora. Área de muestreo y colecta de muestras

El estudio de muestreo se desarrolló en el desierto de altar Sonora, el cual se encuentra localizado a una latitud N 31° 27' 36" a 32° 21' 36" y una longitud W 112° 59' 24" a 114° 23' 24" (Fig. 1). Las figuras concéntricas de color amarillo señalan los sitios de muestreo. Se colectaron muestras de cinco plantas jóvenes de palo fierro (*Olneya tesota*) creciendo en un diámetro de 20 km a la redonda del municipio de Altar, Sonora y una distancia entre árbol y árbol de 2 km; después de cada árbol fueron extraídas una porción del sistema radical (50 g). Cabe indicar que muestras de suelo que albergaron a las plantas muestreadas fueron obtenidas durante la colecta. 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). Se consideraron un periodo de recolección que fue en temporada seca (ninguna precipitación pluvial). Las muestras obtenidas se transportaron al laboratorio agrícola "Dr. Félix Ayala Chairez" 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.



Figura 1. Mapa fisiográfico del desierto de Sonora, indicando los puntos de muestreo (árboles de *Olneya tesota*).

Aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a rizósfera de palo fierro Sonorense

Para aislar y contar bacterias de las raíces y de suelo adherido que se extrajeron de los árboles muestreados, las raíces se enjuagaron completamente con agua de la llave y con agua destilada estéril, inmediatamente fueron tratadas con el detergente Tween 20 al 2% (Sigma) por 10 minutos para remover cualquier tipo de polvo. Después de eliminar el detergente por enjuagues abundantes con agua destilada estéril, se cortaron las raíces con un bisturí estéril en piezas pequeñas (2.0 cm). Cinco piezas se colocaron en viales de cultivo tapados con torunda de algodón y gasa que contenían 20 ml de medio líquido Rennie y OAB (3.5 gr/l agar bacteriológico) libre de nitrógeno (Rennie, 1981) y se incubaron durante 48 h a 30 ± 1

y 55°C con 150 rpm de agitación. La película bacteriana que se formó en el medio de crecimiento fue separada y se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} haciendo uso de solución salina al 0.85%. Tres réplicas de la dilución fueron dispersadas en medio sólido Rennie a diferentes concentraciones de salinidad (0.0., 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl). Las placas (12) fueron incubadas a 30 y 55°C durante cuatro días.

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. Posteriormente de la película bacteriana formada en los medios líquidos, se procedió a realizar la misma actividad que en raíces, la cual fue previamente descrita.

Enseguida, de los crecimientos bacterianos de suelo y raíz de palo fierro observados a diferentes concentraciones de sales y en diferentes temperaturas, fueron purificados utilizando el medio de cultivo Rennie, por la técnica de estriado. Los morfotipos coloniales se seleccionaron por sus características de forma, color, borde, apariencia, consistencia y por su morfología celular; tinción gram, forma tamaño, movimiento pruebas bioquímicas como la tinción de Gram. Todas se purificaron en los mismos medios de manera convencional y utilizando glicerol al 10% (v/v) como crioprotector (Malik, 1988).

Posteriormente, se realizó la prueba indirecta de fijación de nitrógeno (reducción de acetileno) la cual consistió en lo siguiente acorde a Holguin *et al.*, (1992): los morfotipos abundantes en forma porcentual, se purificaron y se inocularon en viales conteniendo medio semisólido Rennie al 2% y sin nitrógeno e incubados de la misma forma inicial. Cuando se observó la banda de crecimiento (dos días), se reemplazaron las torundas de algodón por tapones de hule y sello de aluminio (sellado hermético). Con jeringas estériles se reemplazaron el 10% de aire contenido en los viales por acetileno puro (ARA por sus siglas en inglés) a etileno, el cual se determinó por cromatografía de gases utilizando la columna Porapak N, como describe Holguin *et al.*, (1992). Para esta prueba se consideró como control biológico a *Azospirillum halopraeferens*, bacteria donada por el Centro de Investigaciones

Biológicas del Noroeste. Todos los morfotipos se conservaron en glicerol al 15%, en viales criogénicos a temperatura de -40°C . Cuatro de las cepas cultivables y que resultaron con alta fijación de nitrógeno (alta actividad de reducción de acetileno) se enviaron para su identificación a Accugenix (Newark, De, USA) a nivel molecular por secuenciación del 16S rRNA.

Solubilización de fosfatos por bacterias aisladas de rizósfera de palo fierro con alta capacidad de fijación de nitrógeno

De los cuatro microorganismos con alta capacidad de reducción de acetileno, fueron sometidos a la prueba de solubilización de fosfatos. La prueba 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) conteniendo cuatro diferentes concentraciones de cloruro de sodio (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M); el medio modificado por Vázquez *et al.*, (2000), la siembra se realizó en placa por extensión en superficie e incubadas a 30 y 50 $^{\circ}\text{C}$. 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 Vázquez *et al.*, (2000).

Evaluación de *Rhodococcus fascians* en la germinación de Palo fierro (*Olneya tesota*) bajo diferentes salinidades *in vitro*

Colecta de la semilla de *Olneya tesota*

Durante el verano (junio-julio) de 2009 se colectaron semillas maduras de un árbol de palo fierro de tres años de edad (paralelo $30^{\circ} 33'$ de latitud norte y $111^{\circ}07'$ longitud oeste del meridiano de Greenwich y a 548 m de altura sobre el nivel del mar). Las semillas se depositaron en un recipiente térmico o hielera a 4 $^{\circ}\text{C}$, para evitar que las semillas se infectaran por enfermedades y/o fueran consumidas por insectos. 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 desechó el agua y se adicionó 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 desechó el desinfectante Tween 20 con agua destilada estéril para eliminar los excesos del mismo. Enseguida se adicionó 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 decantó 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).

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). Lo anterior se realizó acorde con Carrillo *et al.* (1998). Posteriormente se depositaron cinco 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; para la presente prueba se evaluó a *Rhodococcus fascians*, considerando como control biológico a la bacteria *Azospirillum halopraeferens* Au4^T DSM 3675^T 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 treinta 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:

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

donde n_1, n_2, \dots, n_{30} representan el número de semillas germinadas 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 factorial 3×4 (2 bacterias y un testigo y 4 niveles de salinidad). 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).

Longitud radicular y altura de plántula

El periodo de observación se llevó a cabo treinta 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 se midieron 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.

Peso fresco de plántula de palo fierro

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.

Cuantificación de células bacterianas (Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) adheridas al sistema radicular de plantas de *Olneya tesota*

Esta prueba se llevó a cabo al finalizar el estudio (treinta 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 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.

Evaluación de *Rhodococcus fascians* en la germinación de palo fierro (*Olneya tesota*) en diferentes salinidades: 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 *Rhodococcus fascians*, *A. halopraeferens* Au4^T DSM 3675^T y un control sin inocular, sometándose a cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl); para la siembra se utilizaron cinco macetas por repetición en los 12 tratamientos de salinidad, arrojando un total de 60; 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 en 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 macetas por repetición en los tratamientos de salinidad, arrojando un total de 60 macetas con una semilla 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 las macetas; las aplicaciones se efectuaron cada tres días en cada uno de las macetas.

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 cada dos días (tasa de emergencia) y finalmente el porcentaje de emergencia fue determinado a los 13 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 factorial 3x4 (2 bacterias y un testigo x 4 niveles de salinidad). 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).

Longitud radicular de plántula y altura de planta

La observación se llevó a cabo a los 8 meses 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.

Peso fresco y peso seco de plántula

Se evaluaron 60 plantas (5 plantas por tratamiento), para determinar el peso fresco de planta, incluyendo raíz, lo cual se realizó con una balanza analítica Mettler-Toledo GmbH. Para el caso de peso seco 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.

Cuantificación de células bacterianas adheridas al sistema radicular de plantas de palo fierro

Esta prueba se llevó a cabo al finalizar el estudio (8 meses después); se desarrolló la misma metodología indicada in vitro.

Análisis bromatológicos

Las variables evaluadas fueron, contenido de proteínas, lípidos totales y cenizas. La técnica para obtener proteínas se desarrolló 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).

RESULTADOS

Aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno en la rizósfera de *Olneya tesota*

Con la finalidad de considerar las características morfológicas y la abundancia de las bacterias en el sistema de raíz y suelo de *Olneya tesota*, 17 colonias fueron seleccionadas. Estos 17 morfo-tipos estuvieron presentes en los cinco sitios de muestreo. Cuando se cultivaron en diferentes concentraciones de cloruro de sodio, las 17 colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas crecieron más rápidamente en 0,25 M de NaCl a los 30 y los 55 °C. A esta concentración, el crecimiento suficiente de bacterias se produjo en 14 a 33 h, mientras que a 0, 0,5 y NaCl 0,75 M, el crecimiento fue más lento teniendo en cuenta las dos temperaturas. Estos resultados indican la capacidad de las bacterias para crecer en un ambiente salino seco árido, que tiene 0,3 M de NaCl (Velarde *et al.*, 2003).

Determinación de la capacidad de fijación de N₂ de las bacterias aisladas e identificadas

Durante los ensayos de reducción de acetileno, sólo cuatro de las 17 especies aisladas mostraron una actividad significativa ($P < 0.05$) de reducción de acetileno, de las cuales, las bacterias fijadoras de nitrógeno que mostraron alta capacidad de reducción de acetileno fueron identificadas y los resultados mostraron la identidad con *Rhodococcus fascians* (Fig. 2), *Kocuria polaris*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Planococcus antarcticus*, que están presentes en suelo y el agua, asociados con las plantas y tienen una importante capacidad de fijación de nitrógeno (Vázquez *et al.*, 2000; Puente, 2004; Villegas *et al.*, 2010). Los valores de los ensayos de reducción de acetileno de *Rhodococcus fascians* fue $6,13 \pm 0,23 \text{ nmol cultura}^{-1} \text{ h}^{-1}$, en contraste con el control de *Azospirillum halopraeferens*, con $7,13 \pm 1,7 \text{ nmol cultura}^{-1} \text{ h}^{-1}$. La reducción de acetileno de *Kocuria polaris* fue $6,05 \pm 0,35 \text{ nmol cultura}^{-1} \text{ h}^{-1}$, *Bacillus amyloliquefaciens* con $5,99 \pm 0,71 \text{ nmol cultura}^{-1} \text{ h}^{-1}$, y *Planococcus antarcticus* de $5,73 \pm 0,96 \text{ nmol cultura}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

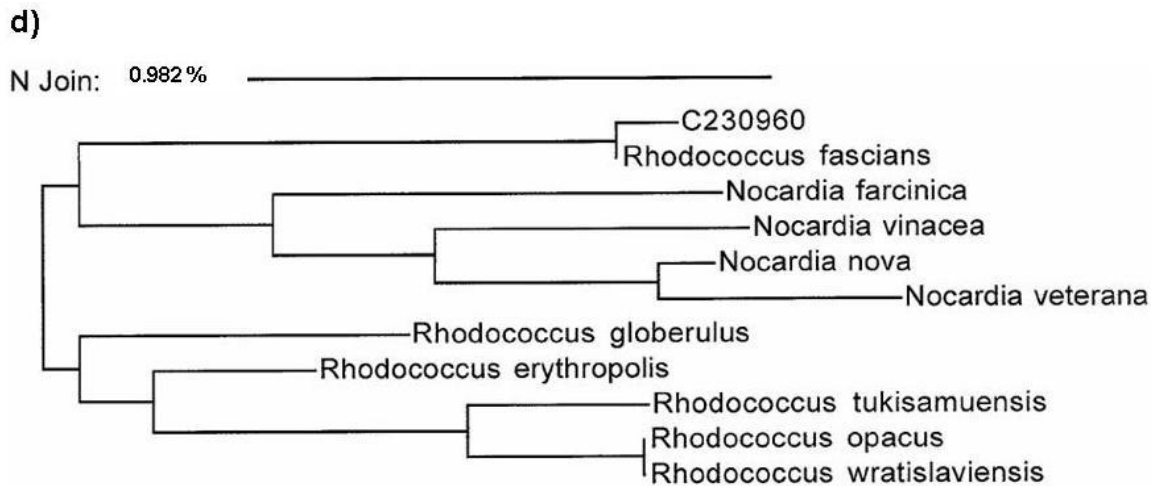


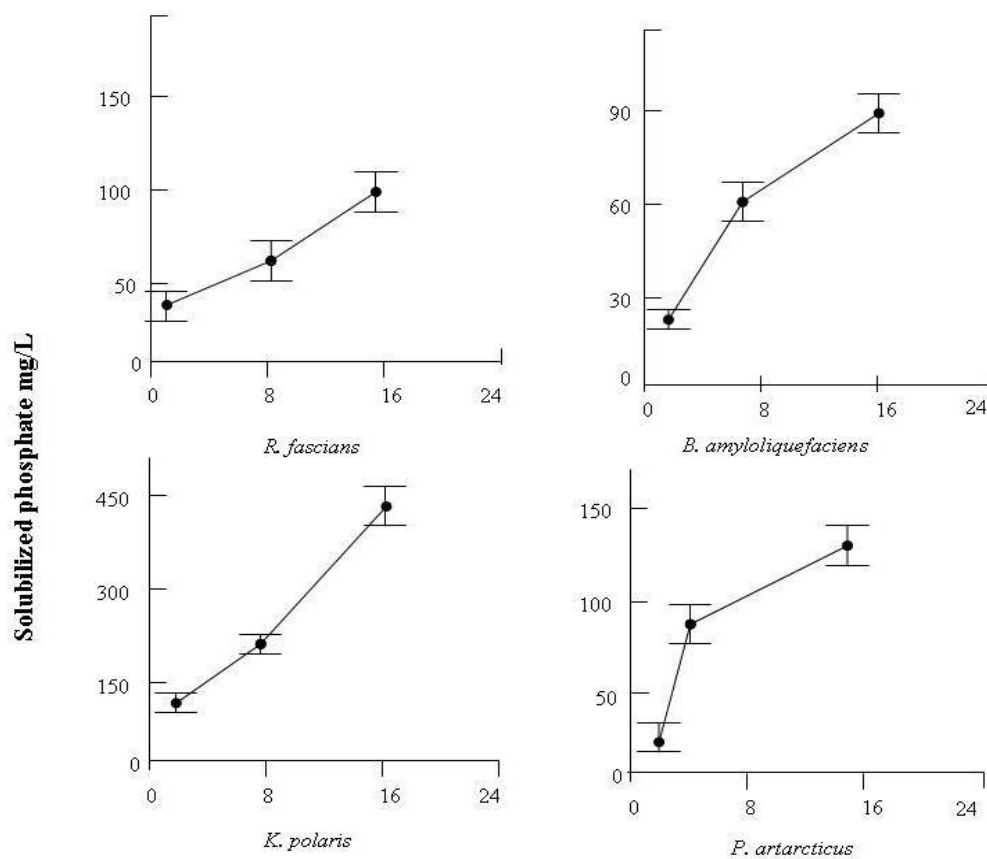
Figura 2. Árbol filogenético de la secuencia del 16 rRNA, de la bacteria aislada (*Rhodococcus fascians*) de rizósfera de *Oneya tesota* del desierto de Sonora.

Determinación de la capacidad de solubilizar fosfatos

En los resultados de la prueba de solubilización de fosfato, después de 16 h de incubación, las cuatro especies de bacterias indicaron su capacidad de disolver fosfatos insolubles. Sin embargo, en la solubilización de fosfato entre las especies estudiadas, *Kocuria polaris*, mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) en comparación con los otros géneros estudiados (*Rhodococcus fascians* y *Planococcus antarcticus* y *Bacillus amyloliquefaciens*), teniendo en cuenta la salinidad a 0, 0,25 y 0,75 M de NaCl a los 30 y 55 ° C (Cuadro 2). Lo contrario ocurrió en 0,5 M a 30 ° C en *Bacillus amyloliquefaciens* que mostró valores más altos, ($P < 0.05$) mientras que a 50°C fue *Planococcus artracticus*.

De acuerdo con la solubilización de fosfato de cuatro especies de bacterias solubilizadoras de fosfatos en el medio de cultivo que contienen fosfato de calcio insoluble, la mayor solubilización fue de 16 h después de la incubación. Entre las especies de bacterias tratadas, *Kocuria Polar* fue el mejor del género y la menos efectiva fue *B. amyloliquefaciens* (Fig. 3).

Figura 3. Solubilización de fosfatos de *Rhodococcus fascians*, *Kocuria polaris*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Planococcus antarcticus* en medios de cultivo conteniendo fosfato de calcio insoluble. Barras representan ES (error estándar). Cuando el ES está ausente en las barras, el ES es más pequeño que el punto.



Cuadro 2. Medias de halos (mm) como producto de la solubilización de fosfatos de *Rhodococcus fascians*, *Kocuria polaris*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Planococcus antarcticus*, en concentraciones de salinidad y temperatura. Literales iguales en valores medios indican valores no significativos con $P < 0.05$. Las comparaciones fueron desarrolladas dentro de las columnas usando la prueba de rango múltiple de Duncan. Los valores representan la media de cinco repeticiones.

Inoculante (Bacteria)	Salinidad (NaCl)							
	0 M		0.25 M		0.5 M		0.75 M	
	Temperatura y medida de halos (mm)							
	30°	50°	30°	50°	30°	50°	30°	50°
<i>Kocuria polaris</i>	4.11a	3.78a	4.12 ^a	2.12a	0.78c	1.09b	1.98a	1.78a
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1.19d	1.78c	1.4d	1.44c	2.12a	0.44c	1.11b	1.44b
<i>Rhodococcus fascians</i>	1.44c	3.44b	1.78c	1.78b	1.44b	1.08b	0.44c	1.11c
<i>Planococcus antarcticus</i>	2.44b	1.78c	2.78b	1.44c	0.78c	1.44a	0.44d	1.44b

Acorde a los resultados y debido a que *Olneya tesota* debe ser mejorada para la reforestación de zonas perturbadas y ser usado por las industrias de alimentos y productos agrícolas (FAO 1998), es importante tener en cuenta las estrategias para su reproducción y cultivo. En este sentido, se encontró la presencia de microorganismos promotores del crecimiento vegetal asociados a las raíces de *O. tesota*. Se observó que 17 colonias que crecieron en los medios de cultivo libre de una fuente de nitrógeno, fueron incapaces de reducir acetileno en grandes cantidades, excepto uno solo. Esto podría ser debido a la co-dependencia de otras bacterias, lo cual es un fenómeno bastante común entre los microorganismos (Drozdowiez y Ferreira, 1987; Will y Sylvia, 1990; Holguín *et al.*, 1992; Rönkkö *et al.*, 1993; Isopi *et al.*, 1995; Holguín y Bashan, 1996; Rojas *et al.*, 2001).

Rhodococcus fascians tiene la capacidad de fijar nitrógeno y producir fitohormonas (Haahtela *et al.*, 1990; Kozyrovskaya *et al.*, 1990; Conrad *et al.*, 1992; Rodelas *et al.*, 1996; Zexun y Wei, 2000), por lo que se propuso evaluar los posibles

efectos de la bacteria benéfica en etapas tempranas de *Olneya tesota*, utilizando la bacteria *A. halopraeferens* (Puente y Bashan, 1993; Puente *et al.*, 1999) como control.

Evaluación de inoculantes y NaCl en la germinación y crecimiento de plántulas de *Olneya tesota*

Cuando *Rhodococcus fascians* en etapa de germinación fue inoculada con *Azospirillum halopraeferens* como control biológico, los resultados mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos (Cuadro 3). Además, se observó que cuando la salinidad es mayor, la inhibición de la germinación fue significativa con $P < 0.05$ para *Olneya tesota*. Semillas cultivadas con *Azospirillum halopraeferens* y *Rhodococcus fascians* germinaron en un 20% más a menudo ($P < 0.05$) que a 0 M NaCl. Los tratamientos con mayor salinidad afectaron negativamente el porcentaje de germinación, independientemente de la presencia de bacterias. Un desarrollo similar se obtuvo en la tasa de germinación, los resultados mostraron que *Rhodococcus fascians* el 100% se obtuvo a los 6 días, mientras que *A. halopraeferens* (90%) a los 9 días (tanto en 0 y 0,25 M de NaCl, respectivamente). El control sin bacterias mostró un 78% a los 6 días en 0 y 0,25 M de NaCl. Por otro lado, las bacterias fijadoras de nitrógeno influyeron en el crecimiento de plantas (altura de la planta y la longitud de las raíces), con diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos (Cuadros 3 y 4). El tratamiento con *Rhodococcus fascians* promovió el crecimiento de plántulas y un mayor número de células bacterianas adheridas se observó en las raíces con *Rhodococcus fascians* (Cuadro 3). Resultados en el mismo cuadro 3 confirman la tendencia a la baja de unidades formadoras de colonias bacterianas (UFC), con aumento de la salinidad. *Rhodococcus fascians* y *A. halopraeferens* no se vieron afectados por debajo de 0,25, 0,5 y 0,75 M de NaCl, respectivamente, cuando se ensaya en *Olneya tesota*. Sin embargo, la longitud del sistema de raíces se incrementó con *Rhodococcus fascians* con una diferencia significativa ($P < 0.05$) en comparación con *A. halopraeferens*. Esta especificidad de la asociación planta-bacteria probablemente es

controversial. Estos resultados concuerdan con Baldani y Dobereiner (1980) y Arsac *et al.* (1990); quienes indican que los resultados dependen de la especificidad de la planta de la cepa hospedera, pero entra en conflicto con Okon y Hadar (1987), citado por Arsac *et al.* (1990), quien afirma que el efecto no es dependiente de la tensión entre las diferentes especies de plantas.

Porcentaje final de emergencia de *Olneya tesota* con la inoculación de *R. fascians* y *A. halopraeferens* en condiciones de invernadero

Con respecto a la prueba de emergencia de *Olneya tesota*, el tratamiento *R. fascians* mostró el máximo porcentaje ($P < 0.05$) de emergencia de semillas a una salinidad de 0 y 0.25 M de NaCl, los resultados presentan una actividad más activa (100 y 96%), en comparación con el tratamiento inoculado con *A. halopraeferens* que se vio reducida a un 84% a 0.25 M de NaCl, comparado con la concentración salina 0 M de NaCl que arrojó un nivel mas bajo de emergencia (68%). Sin embargo, el control redujo los niveles de emergencia hasta un 24 y 20% a una salinidad de 0 y 0.25 M de NaCl. Asimismo, se observó que *R. fascians* y *A. halopraeferens* muestran niveles de germinación muy bajos a una salinidad de 0.5 y 0.75 M de NaCl comparados con el control que no mostró actividad de emergencia ($P < 0.05$). Los resultados indican que la salinidad reduce la tasa de germinación, no obstante, *R. fascians* presenta un mayor incremento en el porcentaje final de emergencia en comparación de los demás tratamientos a una salinidad de 0 y 0.25 M de NaCl (Cuadro 5).

Cuadro 3. Efecto de *Rhodococcus fascians* y *A. halopraeferens* en longitud radicular, altura de planta, peso fresco y peso seco de plántulas de *Olneya tesota*, sometidas a cuatro concentraciones de NaCl. Literales iguales en valores medios indican valores no significativos con $P < 0.05$. Las comparaciones fueron desarrolladas dentro de las columnas usando la prueba de rango múltiple de Duncan. Los valores representan la media de cinco repeticiones. Bacteria ($1 \cdot 10^8$ UFC ml^{-1}).

Palo fierro	Inoculante (Bacteria)	Salinidad NaCl M	Germinación %	Altura de planta (cm)	Longitud radicular (cm)	Peso fresco (mg)	Peso seco (mg)	UFC
<i>Olneya tesota</i>	Testigo	0	67 b	4.99 c	5.49 b	0.41 a	0.17 a	0
<i>Olneya tesota</i>	Testigo	0.25	67 b	4.37cd	4.47 d	0.44 a	0.18 a	0
<i>Olneya tesota</i>	Testigo	0.5	12 d	1.39 g	1.46 f	0.18 c	0.12 bc	0
<i>Olneya tesota</i>	Testigo	0.75	2 f	0.10 i	0.14 g	0.12 e	0.1 d	0
<i>Olneya tesota</i>	<i>R. fascians</i>	0	100 a	6.11 a	5.50 b	0.43 a	0.17 a	3728
<i>Olneya tesota</i>	<i>R. fascians</i>	0.25	100 a	5.59 b	4.99 c	0.46 a	0.18 a	3422
<i>Olneya tesota</i>	<i>R. fascians</i>	0.5	25 c	2.41 f	1.93 e	0.28 b	0.14 b	2444
<i>Olneya tesota</i>	<i>R. fascians</i>	0.75	8 e	0.46 h	0.22 g	0.15 c	0.12 bc	3530
<i>Olneya tesota</i>	<i>A. halopraeferens</i>	0	100 a	6.14 a	5.70 a	0.44 a	0.18 a	3999
<i>Olneya tesota</i>	<i>A. halopraeferens</i>	0.25	100 a	5.43 b	4.89 c	0.43 a	0.17 a	2578
<i>Olneya tesota</i>	<i>A. halopraeferens</i>	0.5	15 d	3.17 dc	2.35 e	0.28 b	0.14 b	2174
<i>Olneya tesota</i>	<i>A. halopraeferens</i>	0.75	9 e	0.31 h	0.16 g	0.13 d	0.1 d	2328

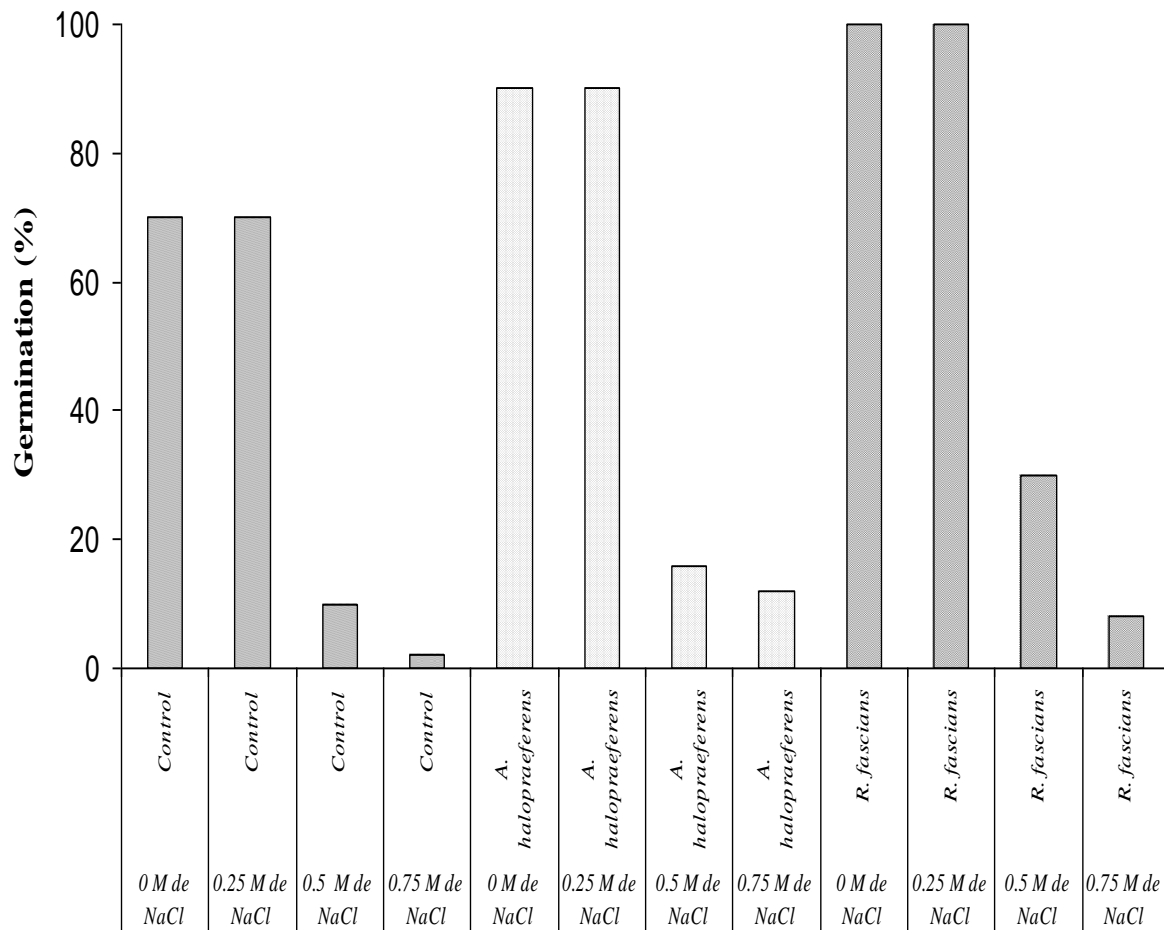


Figura 4. Efecto de *R. fascians* y *A. halopraeferens* en cuatro concentraciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M) en plántulas de *Olneya tesota*.

Cuadro 4. Efecto de *Rhodococcus fascians* y *A. halopraeferens* en el contenido lipídico, proteína y cenizas en plántulas de *Olneya tesota*, sometidas a cuatro concentraciones de NaCl. Literales iguales en valores medios indican valores no significativos con $P < 0.05$. Las comparaciones fueron desarrolladas dentro de las columnas usando la prueba de rango múltiple de Duncan. Los valores representan la media de cinco repeticiones. Bacteria (1×10^8 CFU ml⁻¹).

Palo fierro	Inoculante (Bacteria)	Salinidad NaCl M	Lípidos	Proteínas	Cenizas
<i>Olneya tesota</i>	Testigo	0	0.10 b	10.63 ab	0.93 bc
<i>Olneya tesota</i>	Testigo	0.25	0.09 b	10.43 c	0.89 c
<i>Olneya tesota</i>	Testigo	0.5	0.05 c	4.64 e	0.51 d
<i>Olneya tesota</i>	Testigo	0.75	0.02 d	2.42 g	0.24 f
<i>Olneya tesota</i>	<i>R. fascians</i>	0	0.12 a	10.66 ab	0.99 a
<i>Olneya tesota</i>	<i>R. fascians</i>	0.25	0.12 a	10.65 ab	0.93 bc
<i>Olneya tesota</i>	<i>R. fascians</i>	0.5	0.06 c	5.17 d	0.55 d
<i>Olneya tesota</i>	<i>R. fascians</i>	0.75	0.03 d	2.54 g	0.30 e
<i>Olneya tesota</i>	<i>A. halopraeferens</i>	0	0.13 a	10.79 a	0.99 a
<i>Olneya tesota</i>	<i>A. halopraeferens</i>	0.25	0.13 a	10.66 ab	0.95 b
<i>Olneya tesota</i>	<i>A. halopraeferens</i>	0.5	0.06 c	5.44 d	0.93 d
<i>Olneya tesota</i>	<i>A. halopraeferens</i>	0.75	0.03 d	2.80 f	0.33 e

Altura de plántula, longitud radicular, peso fresco y seco de plántula en invernadero

Respecto a la altura de plántula se desarrollaron favorablemente los tratamientos con los inoculantes en estudio (*R. fascians* y *A. halopraeferens*), dentro de los cuales la mayor altura de planta se mostró a 0 M de NaCl con el inoculante *R. fascians* ($P < 0.05$) con 32.9 cm seguido de *A. halopraeferens* con 32.8 cm; sin embargo no existe diferencia significativa entre los tratamientos. En comparación con el control que presentó un nivel mas bajo de 22.2 cm a la misma concentración de 0 M de NaCl. En la concentración salina de 0.25 M de NaCl existe diferencia significativa entre el control y los dos tratamientos; sin embargo no existe diferencia significativa entre tratamientos analizados. Asimismo, en aquellas concentraciones salinas de 0.5 y 0.75 M de NaCl la altura de las plántulas se mostró reducida en los dos tratamientos y el control ($P < 0.05$) (Cuadro 6).

En longitud radicular a una salinidad de 0 M de NaCl, el tratamiento que sobresalió fue *A. halopraeferens* sobre la bacteria *R. fascians* y el control. Sin embargo, en las subsiguientes salinidades (0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), sobresalieron las bacterias *R. fascians* y *A. halopraeferens* en comparación con el control; los valores indican diferencia significativa de (Cuadro 6).

Con respecto a las variables peso fresco y peso seco, los resultados muestran que no existe diferencia significativa entre los inoculantes y el control tanto en las dos concentraciones salinas de 0 y 0.25 M de NaCl. Sin embargo, al hacer uso de diferentes salinidades, el peso fresco y el peso seco se ve reducido cuando la molaridad de NaCl se incrementa; el tratamiento *A. halopraeferens* sobresalió en comparación del control y *R. fascians*, respectivamente (Cuadro 6). De igual modo, los resultados obtenidos indican que los efectos benéficos de los microorganismos pueden tener un papel principal en las diferentes fases vegetativas, como es el proceso de la germinación (Kim y Weber, 1985). Resultados similares se han obtenido en otras investigaciones aunque estas han sido en diferentes especies de plantas y otro tipo de

bacterias benéficas (Villegas *et al.*, 2010, Rueda *et al.*, 2009, Rueda *et al.*, 2011, Bashan *et al.*, 2009).

Acorde al contenido de proteínas y lípidos, los análisis de varianza no mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en cuanto a su proporción en los tratamientos *Rhodococcus fascians* y *A. halopraeferens*. Se encontró que las plantas inoculadas con las bacterias fijadoras de N₂, resultaron en un incremento de biomasa, reflejándose en valores superiores en comparación con plántulas de *Olneya tesota* del tratamiento control. En cuanto al contenido de cenizas, se reflejó mayor variabilidad en cada tratamiento y en las diferentes salinidades (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), (Cuadro 7).

Cuadro 5. Respuesta de la emergencia de palo fierro inoculado con *Azospirillum halopraeferens* y *Rhodococcus fascians* y su respectivo control sin inoculante en plántulas de palo fierro (*Olneya tesota*), en cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl) en condiciones de invernadero.

Inoculante (Bacteria)	Salinidad M de NaCl	Días							% final de emergencia
		2	4	6	8	10	12	13	
<i>R. fascians</i>	0	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	5	100
<i>R. fascians</i>	0.25	1.4	1.4	4.2	4.2	4.2	4.2	4.8	96
<i>R. fascians</i>	0.5	0	0	0	0	0.2	0.2	0.2	4
<i>R. fascians</i>	0.75	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. halopraeferens</i>	0	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	3.4	68
<i>A. halopraeferens</i>	0.25	1.6	1.6	4.2	4.2	4.2	4.2	4.8	84
<i>A. halopraeferens</i>	0.5	0	0	0	0	0.2	0.2	0.2	4
<i>A. halopraeferens</i>	0.75	0	0	0	0	0	0	0	0
Testigo	0	0	0	0	0	0.4	0.4	1.2	24
Testigo	0.25	0	0	0	0	0.6	0.6	1	20
Testigo	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0
Testigo	0.75	0	0	0	0	0	0	0	0

Cuadro 6. Efecto de la inoculación de *Azospirillum halopraeferens* y *Rhodococcus fascians* y su respectivo control sin inocular en plántulas de palo fierro (*Olneya tesota*) en condiciones de salinidad (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl) e invernadero.

Inoculante (Bacteria)	Salinidad M de NaCl	Altura final (cm)	Longitud radicular (cm)	Peso fresco planta (gr)	Peso seco planta (gr)	Peso fresco de raíz (gr)	Peso seco de raíz (gr)
<i>R. fascians</i>	0	32.9	13.4	130.5	51	30.1	4.8
<i>R. fascians</i>	0.25	22.1	12.8	110.3	48	21.9	4
<i>R. fascians</i>	0.5	2.3	2.5	18	6	2.8	1.2
<i>R. fascians</i>	0.75	0	0	0	0	0	0
<i>A. halopraeferens</i>	0	32.8	13.6	119.7	50.8	30.1	4.6
<i>A. halopraeferens</i>	0.25	22.3	12.9	112	47.2	21.1	4
<i>A. halopraeferens</i>	0.5	0.29	2.5	18	4	3.3	1.2
<i>A. halopraeferens</i>	0.75	0	0	0	0	0	0
Testigo	0	22.2	13.4	106.3	42	21.3	3.4
Testigo	0.25	19.6	13	78	30	20.1	3.1
Testigo	0.5	0	0	0	0	0	0
Testigo	0.75	0	0	0	0	0	0

Cuadro 7. Efecto de *Azospirillum halopraeferens* y *Rhodococcus fascians* en contenidos totales de lípidos, proteínas y cenizas en plantas de palo fierro (*Olneya tesota*) en cuatro concentraciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl) en invernadero.

Inoculante (Bacteria)	Salinidad M de NaCl	Lípidos (mg)	Proteína (mg)	Ceniza (mg)
<i>R. fascians</i>	0	0.61	10.47	0.45
<i>R. fascians</i>	0.25	0.09	10.24	0.45
<i>R. fascians</i>	0.5	0.11	9.23	0.87
<i>R. fascians</i>	0.75	0	0	0
<i>A. halopraeferens</i>	0	0.11	10.18	0.92
<i>A. halopraeferens</i>	0.25	0.09	10.24	0.45
<i>A. halopraeferens</i>	0.5	0.12	9.31	0.86
<i>A. halopraeferens</i>	0.75	0	0	0
Testigo	0	0.1	10.25	0.45
Testigo	0.25	0.11	10.12	0.70
Testigo	0.5	0	0	0
Testigo	0.75	0	0	0

DISCUSION

Con base los resultados obtenidos en las primeras etapas de desarrollo de palo fierro, se pudo constatar que experimentos sobre la germinación de *Olneya tesota*, concuerdan con diversos autores (Allen *et al.*, 1981; Felker y Clark, 1981; Felker *et al.*, 1981; Felger, 1992), y otros estudios en *Prosopis* spp. (Villagra y Bruno, 2005; Villegas *et al.*, 2008). Se constató que la participación de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (*Rhodococcus fascians* y *A. halopraeferens*) en condiciones de salinidad benefician significativamente algunas variables de crecimiento de *O. tesota*.

Estudios similares con inoculantes muestran similitud con los obtenidos en la presente investigación (Rozema *et al.*, 1975; Puente *et al.*, 1999; Goodfriend *et al.*, 2000).

Los efectos positivos de las bacterias en árbol de palo fierro sugieren la producción de las plantas sustancias promotoras del crecimiento, que a menudo son reportados como responsables de la mejora del crecimiento vegetal (Booth *et al.*, 1988; Holguín *et al.*, 1992; Arsac *et al.*, 1990; Haahtela *et al.*, 1990; Turyanitsa *et al.*, 1995; El-Khawas y Adachi 1999; Vázquez *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 1999; Hildebrandt *et al.*, 2000; Goodfriend *et al.*, 2000; Bagwell *et al.*, 2001).

Por otra parte, debido a que la mayor salinidad del agua en este tipo de zonas es un problema, por lo que *Olneya tesota* es un árbol de suelos salinos, puede contribuir a la gestión de zonas áridas con riego con agua salada (Felker y Clark 1981; Felker *et al.*, 1981; Velarde *et al.*, 2003). *Olneya tesota* se puede utilizar para la agricultura y silvicultura, principalmente donde hay una posibilidad de inversión en bosques sostenibles, que pueden contribuir a la gestión de zonas áridas donde el riego con agua salada, incluyendo el agua del mar, es ahora una necesidad. Al mismo tiempo, el cultivo del género *Olneya* contribuiría a equilibrar el ciclo del carbono y reducir el calentamiento global, ya que este árbol crece en zonas secas (Little, 1950; Hastings *et al.*, 1972; Rosenthal, 1977). En el presente trabajo, un método biológico fiable sobre la base del beneficio de las bacterias, se ensayó para

contribuir a mantener o mejorar la fertilidad de los suelos. Por lo anterior, resulta esencial el conocimiento de la microbiota del suelo, sea ésta fijadora de nitrógeno, solubilizadora de fosfatos o promotora del crecimiento vegetal, que se asocia con los diferentes cultivos agrícolas, con el propósito de maximizar los efectos benéficos de la biofertilización y bioestimulación, para desarrollar una producción agrícola más sustentable y atender la creciente demanda de alimentos de calidad y de bajo costo de producción. De esta manera, la utilización de microorganismos con capacidad para promover el crecimiento de las plantas, se presenta como una gran alternativa de biofertilización.

Olneya tesota ha de ser mejorado para la reforestación de zonas perturbadas y ser usado para alimento e industrias agrícolas (FAO, 1998), es importante considerar estrategias para su reproducción y cultivo. Por lo tanto, se considera que *Olneya tesota* podría beneficiarse de microorganismos benéficos presentes en la rizósfera, porque en ella están presentes microorganismos beneficiosos. En este sentido, se puede notar que los microorganismos están asociados con las raíces de *O. tesota*. En el presente estudio se observó que 16 colonias que crecieron en los medios de comunicación N₂-libre fueron incapaces de reducir acetileno en grandes cantidades, excepto uno. Esto podría ser debido a la dependencia de otras bacterias, un fenómeno que es bastante común entre los microorganismos (Drozdowiez y Ferreira 1987; Will and Sylvia, 1990; Isopi *et al.*, 1995; Holguín *et al.*, 1992; y Holguín Bashan, 1996; Rönkkö *et al.*, 1993; Rojas *et al.*, 2001).

Rhodococcus fascians, tiene la capacidad de fijar nitrógeno y producir fitohormonas (Haahtela *et al.*, 1990; Kozyrovskaya *et al.*, 1990; Conrad *et al.*, 1992; Rodelas *et al.*, 1996; Zexun y Wei, 2000); por lo tanto, se propuso evaluar los posibles efectos beneficiosos de la bacteria conocida en *Olneya tesota*. Esto aumentará el conocimiento sobre los microorganismos beneficiosos para *Olneya tesota*, utilizando la conocida bacteria *A. halopraeferens* (Puente y Bashan, 1993; Puente *et al.*, 1999) como control. También se observó que tanto *Azospirillum halopraeferens* y *Rhodococcus fascians* son buenos fijadores de nitrógeno y promotoras del crecimiento vegetal para *Olneya tesota*.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente investigación, muestran que la germinación de *Olneya tesota* es afectada negativamente por la salinidad. Sin embargo, una alternativa existente es la inoculación con las bacterias de *Rhodococcus fascians* y *A. halopraeferens* las cuales mitigan ese efecto negativo, promoviendo la germinación de la semilla y subsecuente en etapa de plántula. Es posible la utilización de bacterias benéficas como *Rhodococcus fascians* y *A. halopraeferens* en plantas forestales con potencial para ser utilizadas en reforestación en áreas deforestadas.

Finalmente, es importante mencionar que este tipo de investigaciones contribuye a ampliar el conocimiento en las posibles alternativas de producción de plantas forestales y efectos en la aplicación de biofertilizantes, los cuales pueden ser utilizados en la agricultura y reducir en cierta medida la aplicación de productos químicos.

El efecto de la salinidad en la germinación de Palo fierro es afectado negativamente. Sin embargo, la inoculación de las bacterias *Rhodococcus fascians* y *A. halopraeferens* mitigan ese efecto negativo, promoviendo la germinación *in vitro* y emergencia en invernadero.

El presente estudio muestra y confirma que la asociación de bacterias benéficas asociadas a la rizósfera de *Olneya tesota*, 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 palo fierro 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 del Estado de Sonora.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexandre, G. y I. B. Zhulin. 2001. More than one way to sense chemicals. *J. Bacteriol.* 183: 4681-4686.
- Allen, O. N y E. K. Allen. 1981. *The Leguminosae: a source book of characteristics, uses and modulation.* The University of Wisconsin Press, Madison. pp. 812.
- An, Q., X. Yang., Y. Dong., L. Feng., B. Kuang y J. Li. 2001. Using confocal laser scanning microscope to visualize the infection of rice roots by GFP- labelled *Klebsiella oxitoca* SA2, and endophytic diazotroph. *Acta Bot. Sinica* 43, 558-564.
- Angulo, A., D. Flores., J. Tejeida y R. Ocampo. 2005. Orégano: oro verde del semidesierto, La riqueza de los bosques mexicanos: más allá de la madera. Experiencias de comunidades rurales. SEMARNAT-CONAFOR-CIFOR-INEOVERBROOK FOUNDATION-People and plants international. México. 200 p.
- Arsac. J., C. Lamothe., J. Fages. 1990. Growth enhancement of maize (*Zea mays* L) through *Azospirillum lipoferum* inoculation: effect of plant genotype and bacterial concentration. *Agronomie.* 10: 640-654.
- Atlas, M. A, y R. Bartha. 2002. *Ecología microbiana y microbiología ambiental.* Ed. Addison Wesley. México.
- Bagwell, Ch., M. Dantzler., P. Bergholz y Ch. Llovell. 2001. Host-specific ecotype diversity of rhizoplane diazotrophs of the perennial glasswort *Salicornia virginica* and selected salt marsh grasses. *J. Aquatic Microbiol. Ecology.* 23: 293-300.
- Baldani, V. D. 1980. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biol. Biochem.* 12: 443-439.
- Barlow, P. W. 2003. The root cap: cell dynamics, cell differentiation and cap function. *Plant Growth Regul.* 21, 261-286.
- 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.,. and H. Levanony. 1987. Horizontal and vertical movement of *Azospirillum brasilense* Cd in the soil and along the rhizosphere of wheat and weeds in controlled and field environments. *J. Gen. Microbiol.* 133: 3473-3480.

- Bashan, Y., Puente, M. E., Rodriguez-Mendoza, M. N., G. Toledo., G. Holguin., R. Ferrera-Cerrato and S. Pedrin. 1995. Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1938-1945.
- Bashan, Y. y G. Holguin. 1998. proposal for the division of plant growthpromoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-pgpb (plant growth-promoting bacteria) and pgpb. *Soil Biol. Biochem.* 30(8): 1225-1228.
- Bashan, Y., G. Holguin y L. E. De-Bashan. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology* 50:521-577.
- Bashan, Y., B. Salazar and M. E. Puente. 2009. Responses of native legume desert trees used for reforestation in the Sonoran Desert to plant growth-promoting microorganisms in screen house. *Biol Fertil Soils* 45:655–662.
- Becerra, R. 2000. Las cactáceas, plantas amenazadas por su belleza. *Biodiversitas* 6. pp. 2 - 5.
- Benítez, V. J. 2006. Efecto del laboreo en el desarrollo del sistema radicular del trigo, habas, garbanzos y girasol en un vertisol de secano. En Tesis doctoral Universidad de Córdoba. pp 30-32.
- Bloemberg, G. V. 2007. Microscopic analysis of *plant*-bacterium interactions using auto fluorescent proteins. *Plant pathology.* 119-3.301-309.
- Broughton, W., S. D' jabbouri y X. Perret. 2000. Keys to symbiotic harmony. *Bacteriology* 82 (20): 5641-5652.
- Booth, T., S. Gorrie y T. Mushin. 1988. Life strategies among fungal assemblages on *Salicornia europaea* aggregate. *J. Mycologia.* 2: 176-191.
- Carrillo, A., Puente, M., Castellanos, T, y Bashan, Y. 1998. Aplicaciones Biotecnológicas de Ecología Microbiana. Manual de Laboratorio. Pontificia Universidad Javeriana, Santafé de Bogotá, Colombia- Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste La Paz, Baja California Sur, México, 51p.
- 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, J. y J. L. Mota-Villanueva. 2006. Guía Legal para Dueños de Bosques en México. WWF-México. México, D.F. México. 204 p.

- CONABIO-CONANP. 2009. Palo Fierro (*Olneya tesota*). Fichas de especies mexicanas. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. México D.F. Compilado por Elizabeth Torres Bahena. Revisado por Carlos Galindo Leal. Junio 2009.
- CONACUBIO, Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de Biodiversidad. 2007. México. www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/zygophyllaceae/larreatridentata/imagenes/habito-en-habitat.jpg. (Octubre, 2007).
- Conrad, k., B. Bettin y S. Neumann. 1992. The cytokinin production of *Azospirillum* and *Klebsiella*, possible ecological effects. In: M. Kaminek et al. (eds), Physiology and biochemistry of cytokinins in plants, pp. 401-405. Symposium Liblice, The Czech Republic.
- Dakora, F. y D. Phillips. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and soil* 245: 35-42.
- De-Bashan L. E y Y. Bashan. 2003. Bacterias promotoras de crecimiento de microalgas: una nueva aproximación en el tratamiento de aguas residuales. *Revista colombiana de biotecnología* 5(2):85 – 90.
- Dibut, B., M. Ortega., R. Martínez., L. Fey y Y. Ríos. 2005. Nuevos aislados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en cultivos de importancia económica para Cuba. *Cultivos tropicales*. 26(2): 5-10.
- Drozdowiez A, Ferreira S (1987) Nitrogenase activity in mixed cultures of *Azospirillum* with other bacteria. *Zentralblatt fur Mikrobiologie*. 142: 487-493.
- El-khawas, H., K. Adachi. 1999. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effects on rice roots. *Biol. Fertil. Soils*. 29: 377-381.
- Enríquez, E., D. S. Koch y M. S. González-Elizondo. 2003. Flora y vegetación de la Sierra de Órganos, municipio de Sombrerete, Zacatecas, México. *Acta Botánica Mexicana*. 64: 45-89.
- Fages, J. 1992. An industrial view of *Azospirillum* inoculants: formulation and application technology. *Symbiosis*, 13: 15-26.
- Ferrera-Cerrato, R., y Alarcón, A. 2001. La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *Ciencia Ergo Sum*. 8: 175-183.
- Felger RS (1992) Reflections on a desert legume trinity. *Aridus* 4(4):1-4, 7.

- Felker, P., P.R. Clark. 1981. Nodulation and nitrogen fixation (acetylene reduction) in desert ironwood (*Olneya tesota*). *Oecologia* 48:292-293.
- Felker, P., P.R. Clark., A.E. Laag y P. F. Pratt. 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.
- Frioni, L. 1999. Procesos microbianos. Fijación biológica del nitrógeno por diazotrofos en vida libre y en la rizosfera. Editorial de la fundación Unvirsidad Nacional de Río Cuarto argentina.
- Frommel M. I., G. S. Pazos and J. Nowak. 1991. Plant growth stimulation and biocontrol of *Fusarium* wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) by co-inoculation of tomato seeds with *Serratia plymuthica* and *Pseudomonas* sp. *Fitopatología* 26: 66-73.
- Geoola, F., Y. Kashit., A. Brickman. 2003. Influence of agrochemicals on greenhouse cladding materials, *Science Direct Polymer Degradation and Stability*. 80: 575-578.
- Gilroy, S y D. Jones. 2000. *Trends Plant Sci*. 5. 56.
- Glick, R. B. and Y. Bashan. 1997. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnology Advances*, 15(2) 353-378.
- Goddard, V. J., M. J. Bailey., P. Darrah., A. K. Lilley and P. I. Thompson. 2001. Monitoring temporal and spatial variation in rhizosphere bacterial population diversity: A community approach for the improvide selection of rhizosphere competent bacterial. *Plant and Soil*, 232: 181-193.
- Goodfriend, W., M. Olsenm y R. Frye. 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, Korhonen T (1990) Root-associated Enterobacter and *Klebsiella* in *Poa pratensis*: Characterization of an iron-scavenging system and substance stimulating root hair production. *Mol. Plant Microbe Interact*. 3: 358-365.

- Hastings, J. R., R. M. Turner., D.K. Warren. 1972. An atlas of some plant distributions in the Sonoran Desert. The University of Arizona, Institute of Atmospheric Physics, UA-IAP-TR-72-21, Tucson, Arizona.
- Hildebrandt, U., K. Janetta., F. Ouziad., B. Renne.,K. Nawrztth y H. Bothe. 2000. Arbuscular mycorrhizal colonization of halophytes in Central European salt marshes. *J. Mycorrhiza*. 4: 175-183.
- Heijnen, C. E., C. H. Hok-A-Hin and J. A. van Veen. 1992. Improvements to the use of bentonite clay as a protective agent, increasing survival levels of bacteria introduced into soil. *Soil Biol. Biochem*. 24: 533-538.
- Hernández, A., R. Plana., M. G. Martín y J. L. Santander. 2002. Estudios de algunos géneros microbianos asociados a defentes variedades de Trigo (*Triticum aestivum* L.) en suelo ferralítico rojo. *Cultivos tropicales*. 23(1): 15-20.
- Hernández, R. A., M. E. Perez., M. G. V. del Valle y A. N. H. Lauzardo. 2006. Perspectiva del empleo de rizobacterias como agentes de control biológico en el cultivo de importancia económica. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24(1): 42-49.
- Hirsch, A., W. Bauer., D. Bird., J. Cullimore., B. Tyler y J. Yoder. 2003. Molecular signals and receptor: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. *Ecology* 84 (4): 858-868.
- Holguin, G., Guzman, M. A., and Bashan, Y. 1992. Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangroves trees, isolation, identification and in vitro interaction with rhizosphere *Staphylococcus* sp. *FEMS Microbiology Ecology* 101,207-216.
- Holguin, G y Y. Bashan. 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.
- Isopi, R., P. Fabbri., M. Del Gallo y G. Puppi. 1995. Dual inoculation of *Sorghum bicolor* (L). *Moench* spp. bicolor with vesicular arbuscular mycorrhizae and *Acetobacter diazotrophicus*. *Symbiosis*. 18: 43-55.
- Ito T, Okane I, Nakgiry A (1999) Mycoflora of the rhyzosphere of *Salicornia europaea* L., a halophytic plant. *Res. Commun*. 19: 34-40.
- Jackson, A. M., Whipps, J. M. and Lynch, J. M. 1991. Production, delivery systems, and survival in soil of four fungi with disease biocontrol potential. *Enzyme Microbiol. Technol*. 13: 636-642.

- Jana, C. A y D. T. Pinochet. 2004. Evaluación del método de estudio en las propiedades químicas de rizósfera de ballica inglesa (*Iolium perenne* L.) en un andisol. *Suelo Nutr. Veg.* 4 (2): 32-38.
- Jiménez, D., C. Virgen, F. Tabares y P. Olalde. 2001. Bacterias promotoras de crecimiento de plantas: agro-biotecnología avance y perspectiva.
- Jungk, A. 2001. Movimiento de nutrientes a la interfase suelo-raíz. *R.C. Suelo Nutr. Veg.* 1(1) 1-18.
- Kabir, M and D. Faure. 1996. Identification of *Azospirillum* by oligonucleotide probes after isolation from soil and *Sorghum* rizoplan contaminated or not by the parasitic plant: Striga. *Advances in Applied Microbiology* 35: 195-253.
- Kapulnik, Y., Y. Okon y J. Kigel. 1981. Effects of temperature, nitrogen fertilization and plant age on nitrogen fixation by *Setaria italica* inoculated with *Azospirillum brasilense* (strain cd). *Plant Physiology.* 68:340-343.
- Kapulnik, Y. 2002. Plant growth promoting by Rhizosphera Bacteria. *Plant roots the Hidden Half.* Ed marcel Dekker. Nueva York. Estados unidos de America. 869-887p.
- Khammas, K., E. Ageron. P. Grimont. and P. Kaiser. 1989. *Azospirillum irakense* sp. Nov. a nitrogen-fixing bacterium associated with the roice roots and rhizosphere soil. *Microbiology.* 140: 679-693.
- King, E. O., Ward, M. K., and Raney, D. E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluoescin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44,301-307.
- Kloepper, J. 1983. Effect of seed piece inoculation with plant growth promoting rhizobacteria on population of *Erwinia carotovora* on potato roots and in daughter tubers. *Phitopathology.* 73:217-219.
- Kloepper, W., Schippers B. and P. Bakker. 1992. Proposed elimination of the term endorhizosphere. *Phytopathology.* 82: 726-727.
- Kozyrovskaya, N., V. Makitruk y E. Rukdashel. 1990. Nitrogen fixing *Klebsiella* spp produce IAA. *Biopolim Kletka.* 6: 93-96.
- Little, E. L. 1950. Southwestern trees - a guide to the native species of New Mexico and Arizona. USD.@j, Handbook No. 9, Government Printing Office, Washington, DC.

- López, G. F. 1992. Microbiología Agrícola. Ed. Universidad Autónoma Chapingo. Primera edición. pp. 13-66.
- Madigan, M., J. Martinko y J. Parker. 1997. Brock. Biología de los microorganismos. Prentice Hall Iberia, México. 986 p.
- 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.
- Mayz, F. J. 2004. Fijación biológica de nitrógeno. *Revista UDO Agrícola* 4 (1): 1-20. pp.1-3
- Mccully, M. 2001. Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. *Aust. Plant physiol.* 28: 983-990.
- Nabhan, G. P. y M. J. Plotkin. 1994. Introduction en: Nabhan G. P. and J. L. carr, editors. *Ironwood: an ecological and cultural keystone of the Sonoran Desert*. Conservation international, Washington, D.C.
- NOM-059. 2001. Protección ambiental especies nativas de México de flora y fauna silvestre. Diario oficial de la federación (published on march 06 2002).
- Okon Y, Hadar Y (1987) "Microbial Inoculants as Crop-Yield Enhancers. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 6: 6-85.
- Olivas, N. G. y J. Q. Rivera. 1984. Informe anual de actividades del Programa de Aprovechamiento Forestal en la Región Lagunera. SARH. 5 p.
- Oliveros, B. A. J., F. A. Macías., C. C. Fernández., D. Marín y J. M. G. Molinillo. 2009. Exudados de la raíz y su relevancia actual en las interacciones alelopáticas. *Quim. Nova*. 32 (1), 198-213.
- Osti, C. L., L. Reyes y D. V. Espinosa. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: una revisión. *Terra latinoamericana*, vol. 22, núm. 2, abril-junio, 2004, pp. 225-239.
- Peña, B. H y I. Reyes. 2007. Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la Lechuga (*lactuca sativa* L.). *Interciencia*. 32(8):560-565.
- Pérez, S. y Torralba, A. 1997. La fijación del Nitrógeno por los seres vivos. Seminario Fisiología Vegetal 21/01. Facultad Biología Oviedo. p. 21.

- Pickup, R. W. y J. R. Saunders. 1990. Detection of genetically engineered traits among bacteria in the environment. *Trends in Biotechnology*, 8: 329-335.
- Prosser J. I. 1994. Molecular marker systems for detection of genetically engineered microorganisms in the environment. *Microbiology*, 140: 5-17.
- Puente, M. 2004. Poblaciones bacterianas endofitas y del rizoplasma de plantas del desierto degradadoras de roca y su efecto sobre el crecimiento del cardón (*Pachycereus pringlei* [S. WATS] BRITT. & ROSS). Doctoral tesis, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S., México. pp. 1-166.
- Puente, M y Y. Bashan. 1993. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strains on germination and seedling growth of the giant columnar cardon cactus (*Pachycereus pringlei*). *Symbiosis*. 15: 49-60.
- Puente, M., G. Holguin., B. Glick y Y. Bashan Y. 1999. Root-surface colonization of black mangrove seedlings by *Azospirillum halopraeferens* and *Azospirillum brasilense* in seawater. *Microbiol. Ecol.* 29: 283-292.
- Rengel, Z. 1997. Root exudation and microflora populations in rhizosphere of crop genotypes differing in tolerance to micronutrient deficiency. *Plant Soil* 196: 255–260.
- Reinhold, B., Hurek, T., Fendrik, I., Pot, B., Gillis, M., Kersters, K., Thielmans, S. and De Ley, J. 1987. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov. a nitrogen-fixing organism associated with roots of *Kallar* grass (*Leptochloa fusca* L. Kunth). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 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.
- Reyes, I. L., H. Alvarez., E. Ayoubi and A. Valery. 2008. Selección y evaluación de Rizobacterias promotoras del crecimiento en Pimiento y Maíz. *Bioagro* 20(1):37-48.
- Rives, N., Y. Acebo y A. Herná. 2007. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del Arroz (*Oryza sativa* L.). perspectivas de su uso en Cuba. *Cultivos Tropicales*. 28(2): 29-38.
- Rodelas, B., I. González., V. Salmeron., C. Pozo y T. Martinez. 1996. Enhancement of nodulation, N₂ fixation and growth of faba bean (*Vicia faba* L.) by combined inoculation with *Rhizobium leguminosarum* by *Viceae* sp and *Azospirillum brasilense*. *Symbiosis*. 21: 175-186.

- Rodríguez, E. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. Appl. Environ. Microbiol. 44: 990-991.
- Rodríguez, Ch. A. J., I. D. T. Cerón., Y. F. Bringas., M. M. R. Badía., J. M. Castañeda y M. H. Pérez. 2005. Caracterización fisiológica de la comunidad microbiana endófito de la caña de azúcar. Revista colombiana de biotecnología. 7(1): 66-75.
- Rodríguez, H., R. Fraga., T. González y Y. Bashan. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. Plant and Soil. 287:15–21.
- Rodríguez-Navarro, D. N., F. Temprano and R. Orive. 1991. Survival of *Rhizobium* sp. (*Hedysarum coronarium* L.) on peat-based inoculants and inoculated seeds. Soil Biol. Biochem. 23: 375-379.
- Rojas, A., G. Holguin., B. Glick y Y. Bashan . 2001. Synergism between *Phyllobacterium* sp (N₂-fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere. Microbiol. Ecol. 35: 181-187.
- Romeu, E. 1996. Palo Fierro: Madera del Desierto. Biodiversitas 9:1-6.
- Rönkkö, R., A. Smilander y K. Haahtela. 1993. Frankia in the rhizosphere of non host plants: A comparison with root-associated N₂ fixing *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Pseudomonas*. Plant Soil.153: 85-95.
- Rosenthal, G. A. 1977. The biological effects and mode of action of L-canavaline, a structural analogue of L- arginine. Quarterly Review of Biology 52:155-178.
- Rozema, J. 1975. The influence of salinity, inundation and temperature on the germination of some halophytes and non-halophytes. Oecol. Plant. 10: 341-345.
- Rueda, P. E. O., P. P. Rangel y M. A. H. Tarazón. 2005. La agricultura orgánica y el uso de biofertilizantes. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 10: 15 – 26.
- Rzedowski, J. 1983. La vegetación de México. Limusa. México. 432 pp.
- Sañudo, T. R. R., P. V. Peñate., C. L. Armenta., H. S. A. Rivero., C. C. Beltrán., M. G. I. Ceceña y J. A. F. Herrán. 2009. Tratamientos pregerminativos en semillas de palo fierro (*olneya tesota* a. gray) y propagación en sustrato de composta de lirio acuático (*eichhornia crassipes*). Ra Ximhai. 5 (3) 329 -333.

- Sharma, A., M. Sahgal y B. Johri. 2003. Microbial communication in the rhizosphere: operation of quórum sensing. *Current science* 85 (8): 1164-1171.
- SAS Institute. 2001. SAS/STAT user's guide. Version 6.12 SAS, Institute, Cary, N.C. U.S.A.
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. 1996. "Norma Oficial Mexicana NOM-008- SEMARNAT-1996. Procedimientos, criterios y especificaciones para realizar el aprovechamiento, transporte y almacenamiento de cogollos.
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. 1997. "Norma Oficial Mexicana NOM-005-SEMARNAT-1997. 2007. Procedimientos, criterios y especificaciones para realizar el aprovechamiento, transporte y almacenamiento de corteza, tallos y plantas completas de la vegetación forestal.
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. 1997. "Norma Oficial Mexicana NOM-005-SEMARNAT-1997. 2007. Procedimientos, criterios y especificaciones para realizar el aprovechamiento, transporte y almacenamiento de corteza, tallos y plantas completas de la vegetación forestal. NOM_05_REC NAT.pdf (julio, 2007).
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. 1997. "Norma Oficial Mexicana NOM-006-SEMARNAT-1997. 2007. Procedimientos, criterios y especificaciones para realizar el aprovechamiento, transporte y almacenamiento de hojas de palma.
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. 1997. "Norma Oficial Mexicana NOM-007- SEMARNAT-1997. Procedimientos, criterios y especificaciones para realizar el aprovechamiento, transporte y almacenamiento de ramas, hojas o pencas, flores, frutos y semillas.
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2005. Anuario Estadístico de la Producción Forestal. Subsecretaria de Gestión para la Protección Ambiental. Dirección General de Gestión Forestal y de Suelos. México, D. F. México. pp. 25- 40.
- Smith, R. S. 1992. Legume inoculant formulation and application. *Can. J. Microbial.* 38: 485-492.
- Soroa. B. M. R., A. F. Hernández., F. C. Soto y E. A. Terry. 2009. Identificación de algunas especies de microorganismos benéficos en la rizosfera de gerbera y su efecto en la productividad *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15(2): 41-48.

- Sullivan, T. 2004. Interactions between soil microbial communities and plant roots: A minireview. 16p. In:
http://www.colostate.edu/Depts/Entomology/Courses/en570/papers_2004/sullivan.Pdf
- Surette, M. and A. Sturtz. 2003. Bacterial endophytes in processing carrots (*Dacus carota* L. var. *Sativus*): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. *Plant and soil* 253:381-390.
- Suzán, H., D. T. Patten and G. P. Nabhan. 1997. Exploitation and conservation of ironwood (*Olneya tesota*) in the Sonoran desert. *Ecological Applications* 7(23):948-957.
- Tenuta, M. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria: prospects for increasing nutrient acquisition and disease control. Department of soil science, university of Manitoba. 76-82p.
- Tebbutt, T. H. Y. 2001. *Fundamentos de control de la calidad del agua*. Ed Limusa. México.
- Trevors, J. T., J. D. van Elsas., H. Lee and L. S. van Overbeek. 1992. Use of alginate and other carriers for encapsulation of microbial cells for use in soil. *Microb. Releases* 1: 61-69.
- Tu, S., L. Ma y T. Luongo. 2004. Root exudates and arsenic accumulation in arsenic hyperaccumulating *Pteris vittata* and non-hyperaccumulating *Nephrolepis exaltata*. *Plant and Soil* 258: 9-19.
- Turner, R. M. 1963. Growth in four species of sonoran desert trees. *Ecology*. 44(4):760-765.
- Turyanitsa, A., A. Petak., M. Nichik y V. Petrosova. 1995. Capacity of *Klebsiella* bacteria to fix atmospheric nitrogen and to produce plant growth hormones. *Mikrobiol. Zh.* 57: 28-34.
- Van Elsas, J. D. and C. E. Heijnen. 1990. Methods for the introduction of bacteria into soil: a review. *Biol. Fertil. Soils*. 10: 127-133.
- Vázquez, C. Y., M. A. I. Batis., S. M. I. Alcocer., D. M. Gual y D. C. Sánchez. 2009. Árboles y arbustos nativos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Proyecto j-084 – CONABIO.
- 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.

- Vázquez, P., G. Holguin., M. Puente., C. López y Y. Bashan. 1999. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol. Fertil. Soils*. 30: 460-468.
- Velarde, M., P. Felker Y C. Degano. 2003. "Evaluation of Argentine and Peruvian *Prosopis* germoplasm for growth at seawater salinities". *Journal of Arid Environments* 55: 515–531.
- Vidussi, F., Claustre, H., Bustillos-Guzman, J., Cailliau, C., and Marty, J.C. 1997. Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton: Separation of chlorophyll a from divinylchlorophyll a and zeaxanthin from lutein. *Journal Plankton Res.* 18: 2377-2382.
- Villagra. P y J. Bruno. 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, E. J. A, P. E. O. Rueda., M. E. Puente., S. R. Muñiz., M. S. M. Avilés., J. O. Grimaldo., A.B. Murillo y R.P. Preciado. 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.
- Villegas, E. J. A; E.O. Rueda; B. Murillo-Amador; M. E. Puente; O. G. Juárez; S. M. Avilés and J. F. Ponce. 2010. Efecto de la inoculación de *Azospirillum halopraeferens* Y *Bacillus amyloliquefaciens* en la germinación de *prosopis chilensis*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12: 19 – 32.
- Vivanco, J. y H. Bais. 2004. Unraveling the hidden potential of root exudates: from allelochemicals to antibiotics. (Abstracts 23004) In: <http://lamar.colostate.edu/~jvivanco>.
- Walker, T., H. Bais., E. Grotewold y J. Vivanco. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiology* 132: 44- 51.
- Wamberg, C., S. Christensen., I. Jakobsen., A. K Muller and S. J. Sorosen. 2003. The mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) affects microbial activity in the rhizosphere of pea plants (*Pisum sativum*). *Soil Biology and Biochemistry* 35: 1349-1357.
- Will, M y D. Sylvia. 1990. Interaction of rhizosphere bacteria, fertilizer and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi with sea oats. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2071-2079.

- Xu, H. 2000. Soil-root interface water potential in sweet corn as affected by organic fertilizer and a microbial inoculants. *J. Crop Prod.* 3: 139-156.
- Zexun, I y S. Wei. 2000. Effect of cultural conditions on IAA biosynthesis by *Klebsiella oxytoca* SG-11. *Chinese J. Appl. Environ. Biol.* 6: 66-69.
- Zhulim, I. B y J. Armitage. 1992. The role of taxis in ecology of *Azospirillum*. *Symbiosis* 13: 199-206.

ANEXOS

ANEXO 1

Titulo corto: Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en palo fierro
Tittle running: plant growth promoting bacteria in palo fierro

PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA ASSOCIATED TO PALO FIERRO (*Olneya tesota*) RHYZOSPHERE IN SONORA DESERT

BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO DE PLANTAS ASOCIADAS A LA RIZÓSFERA DE PALO FIERRO (*Olneya tesota*) EN EL DESIERTO DE SONORA

M. Duarte-Medina, E. O. Rueda-Puente*, M. Cruz-Villegas, J. F. Ponce Medina, L. Avendaño- Reyes, B. Murillo-Amador, L. Partida-Ruvalcaba and J. A. Villegas-Espinoza

(MDM) Estudiante de doctorado. Instituto de Ciencias Agrícolas-Universidad Autónoma de Baja California. Ejido Nuevo León, Mexicali Baja California, México., CP 21705. duartem23@hotmail.com

(MCV) (JFPM) (LAR) (JAVE) Departamento de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Baja California. Ejido Nuevo León, Mexicali, Baja California, México. Apartado postal 21705. lar62@hotmail.com, mcruz1410@hotmail.com, jfponce8@hotmail.com, villegasjorge_a@hotmail.com

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

(BMA) Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo Santa Rita, La Paz, Baja California Sur. Apartado postal 23090. bmurillo04@cibnor.mx

(LPR) Universidad Autónoma de Sinaloa- Carretera Culiacán el Dorado, Km. 17.5. Culiacan, Sinaloa. parpolo@yahoo.com.mx

* Corresponding author: Edgar Omar Rueda-Puente. erueda04@santana.uson.mx

ABSTRACT

Bacteria with the ability to grow on nitrogen-free media and with nitrogenase activity under microaerobic conditions were isolated from roots and soil collected of palo fierro (*Olneya tesota*), which it developed in Sonora desert, and revealed for first time

its association with this kind of microorganisms. Five areas around the Sonora desert were sampled to detect nitrogen-fixing bacteria associated with palo fierro rhizosphere; from these, 17 colonies were isolated. Only one showed high acetylene reduction activity and capacity to solubilize phosphates. This bacterium was identified as *Rhodococcus fascians*. Our results suggest that *Rhodococcus* isolate have a particular affinity to growth at 0 to 0.75 M of NaCl and 30 to 55°C. The effects of *Rhodococcus fascians* were evaluated in germination stage of palo fierro. This bacterium, in conjunction with *Azospirillum halopraeferens*, was tested for growth-promoting ability when inoculated on palo fierro under various saline concentration conditions. During germination stage, *Rhodococcus fascians* showed high specificity to Palo fierro. This is the first report of *R. fascians* as a nitrogen-fixing bacterium associated with the halophyte *Olneya tesota* that they are developed growth in Sonora desert. A reliable biological method, based on beneficial bacteria, suggested helping maintain or improve the fertility of soils to reproduce *Olneya tesota* as an important resource in many arid and semiarid regions of the world.



Villahermosa, Tabasco. 11 de marzo de 2010.

Autor (es): M Duarte-Medina, EO Rueda-Puente, M Cruz-Villegas, JF Ponce Medina, L Avendaño-Reyes, B Murillo-Amador, L Partida-Ruvalcaba, JA Villegas-Espinoza

Tengo el agrado de comunicar que recibimos copia electrónica del manuscrito:

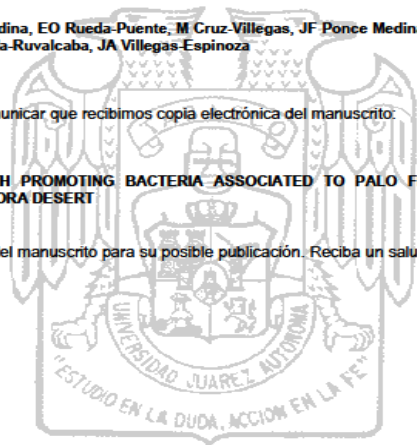
667UC PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA ASSOCIATED TO PALO FIERRO (*Olnya tesota*) RHYZOSPHERE IN SONORA DESERT

Agradecemos el envío del manuscrito para su posible publicación. Reciba un saludo respetuoso.

Atentamente

Dr. Juan Barajas Fernández
Editor

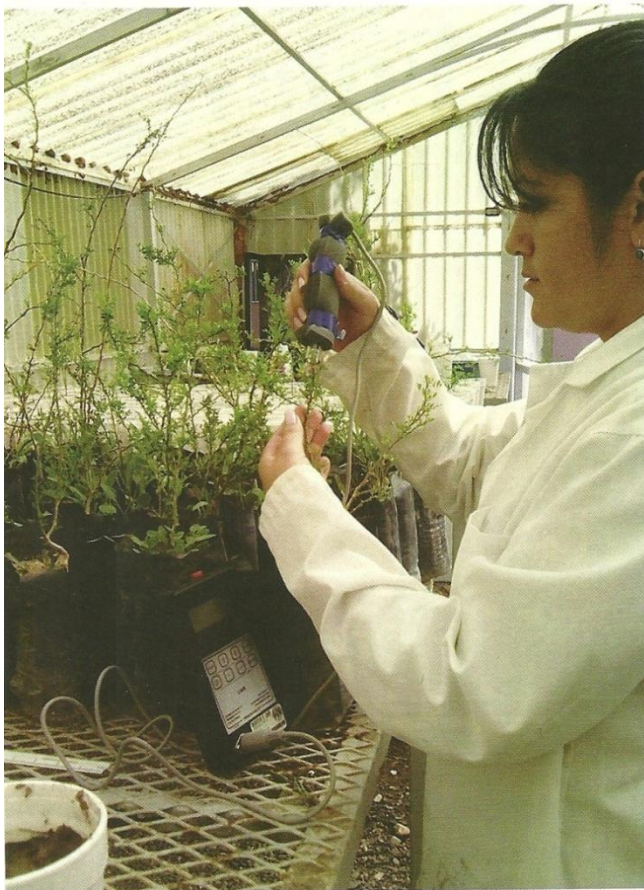
c.p. archivo



ANEXO 2

Nuevas estrategias en el manejo de recursos

Biofertilizantes en la Agricultura orgánica.



M. Duarte-Medina, E. O. Rueda-Puente, M. Cruz-Villegas, J. F. Ponce Medina, L. Avendaño-Reyes, B. Murillo-Amador, L. Partida-Ruvalcaba y J. A. Villegas-Espinoza
Autónoma de Baja California.
Universidad de Sonora, Campus Santa Ana.

La agricultura orgánica constituye un sector de modesta pero muy creciente importancia en el sector agrícola; sus ventajas ambientales y económicas han atraído la atención de muchos países. La reducción del apoyo gubernamental a los insumos agrícolas brinda una oportunidad de conversión de sistemas agrícolas de bajos insumos en sistemas de agricultura orgánica más productivos. La diversificación biológica resultante de los sistemas orgánicos aumenta la estabilidad del ecosistema agrícola y brinda protección contra la tensión ambiental, lo que a su vez aumenta la capacidad de adaptación de las economías agrícolas. La demanda de alimentos y fibras de producción orgánica por parte de los consumidores y la exigencia de un desarrollo más sostenible que plantea la sociedad, ofrecen nuevas oportunidades a agricultores y empresas de todo el mundo.

Considerando lo anterior y con la problemática actual que constituye para la agricultura el mal uso de agroinsumos; anualmente se utilizan en el mundo más de 100 millones de toneladas de fertilizantes nitrogenados y más de 90 millones de potasio y fósforo para obtener cultivos con altos rendimientos. La utilización excesiva de fertilizantes resulta en mayores costos de producción y en la contaminación de suelos y aguas, que han conducido a un proceso de deterioro de sus escasos recursos y a una creciente dificultad para renovarlos, promoviendo realizar un uso integral y diversificado de los recursos naturales, en un ambiente fluctuante y restrictivo.

Los microorganismos con efecto benéfico en las plantas pueden tener un potencial considerable como agentes biocontroladores y biofertilizantes. Se distinguen tres grandes grupos: a) microorganismos fijadores de nitrógeno, b) hongos micorrízicos, c) bacterias promotoras de crecimiento. Este último grupo de bacterias es actualmente conocido como PGPB-Plant Growth-Promoting Bacteria (siglas en inglés) = BPCP (Bacterias promotoras de crecimiento de plantas) como bacterias habitantes de la raíz que estimulan significativamente el crecimiento de plantas.

ANEXO 3

EFFECT OF THE INOCULATION OF *Rhodococcus fascians* and *Azospirillum halopraeferens* IN GERMINATION OF PALO FIERRO (*Olneya tesota* A. Gray) UNDER GREENHOUSE CONDITIONS

*M. Duarte-Medina*¹, *A. G. Alvarado- Martínez*¹, *E. O. Rueda-Puente*^{2*}, *M. Cruz-Villegas*³, *J. F. Ponce Medina*³, *L. Avendaño- Reyes*³, *B. Murillo-Amador*⁴, *M. S. Yépiz- Gómez*⁵.

¹ Estudiante de doctorado. Instituto de Ciencias Agrícolas-Universidad Autónoma de Baja California. Ejido Nuevo León, Mexicali Baja California, México., CP 21705. duartem23@hotmail.com, anagabrielaalvarado@yahoo.com.mx

² Universidad de Sonora, Campus Santa Ana, Carretera internacional y 16 de septiembre s/n, Santa Ana, Sonora, México. Apartado postal 84600. erueda818@gmail.com.

³ Departamento de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Baja California. Ejido Nuevo León, Mexicali, Baja California, México. Apartado postal 21705. lar62@hotmail.com, mcruz1410@hotmail.com, jfponce8@hotmail.com,

⁴ Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo Santa Rita, La Paz, Baja California Sur. Apartado postal 23090. bmurillo04@cibnor.mx

⁵ Departamento de investigación y posgrado en alimentos, Universidad de sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro, Hermosillo, Sonora, México. Apartado postal 83190. msyepiz@guayacan.uson

*Corresponding autor:erueda818@gmail.com

SUMMARY

The growth-promoting bacteria in plants (BGPB) are a group of different species of bacteria can increase plant growth and productivity. Which can benefit plants through their own bacterial metabolism (phosphate solubilizing, producing hormones or fixing nitrogen). At present, desertification is a growing phenomenon worldwide, afforestation is one of the common solutions to combat this problem. Trees for

reforestation are initially grown in greenhouses or nurseries. Among numerous reforestation practices, there is an alternative that inoculation with PGPB. Is a forest species that is endemic Olneya tesota Sonoran Desert, which is in danger of extinction. The objective was to evaluate the effect of bacteria growth promoter in plants with Rhodococcus fascians and Azospirillum halopraeferens on germination and emergence of Ironwood under four salt concentrations (0, 0.25, 0.5 and 0.75 M NaCl) under greenhouse conditions. Were obtained ironwood seeds in the region of Santa Ana, Sonora. Under greenhouse conditions was evaluated emergence percentage, germination rate, height, plant root length, fresh and dry weight of plant, number of bacterial cells attached to the root system, fresh and dry weight of the root. The results indicate that the germination percentage and other variables evaluated decreased as salinity increases. However, these changed positively to inoculation with bacteria R. fascians and A. halopraeferens.

Key words: *rhizospheric bacteria, nitrogen fixation, reforestation, salinity.*

Tropical and Subtropical Agroecosystems

[Ayuda de la revista](#)

IDIOMA

Español ▼

TAMAÑO DE FUENTE

[Make font size smaller](#)[Make font size default](#)[Make font size larger](#)

Envíos activos

Dr. Edgar Omar Rueda Puente

Investigador Universidad Autónoma de Baja California-Universidad de Sonora

Estimado Dr. Envío completado. Gracias por su interés en publicar en Tropical and Subtropical Agroecosystems, su manuscrito "EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE Rhodococcus fascians Y Azospirillum halopraeferens EN LA GERMINACIÓN DE PALO FIERRO (Olneya tesota A. Gray) EN CONDICIONES DE INVERNADERO EFFECT OF

THE INOCULATION OF *Rhodococcus fascians* and *Azospirillum halopraeferens* IN
GER" a Tropical and Subtropical Agroecosystems.

Gracias al sistema de gestión de revistas online que usamos podrá seguir su progreso a través del proceso editorial identificándose en el sitio web de la revista:

URL del manuscrito:

<http://www.veterinaria.uady.mx/ojs/index.php/TSA/author/submission/1619>

Nombre de usuario/o: edgar

Si tiene cualquier pregunta no dude en contactar con nosotros/as. Gracias por tener en cuenta esta revista para difundir su trabajo.

Carlos A. SANDOVAL-CASTRO
Tropical and Subtropical Agroecosystems

Tropical and Subtropical Agroecosystems
<http://www.veterinaria.uady.mx/ojs/index.php/TSA>

» [Envíos activos](#)

ISSN 1870-0462