



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

**ASOCIACIÓN DE CEPAS FIJADORAS DE NITRÓGENO DE
VIDA LIBRE, CON RECURSOS GENÉTICOS DE PASTOS
PARA ZONAS ÁRIDAS.**

RAÚL PLASCENCIA JIMÉNEZ

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2013

La presente tesis titulada: ASOCIACIÓN DE CEPAS FIJADORAS DE NITRÓGENO DE VIDA LIBRE, CON RECURSOS GENÉTICOS DE PASTOS PARA ZONAS ÁRIDAS, realizada por el alumno: RAÚL PLASCENCIA JIMÉNEZ, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO


ADRIÁN RAYMUNDO QUERO CARRILLO

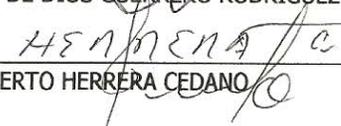
ASESOR


ROBERTO QUINTERO LIZAOLA

ASESOR


JUAN DE DIOS GUERRERO RODRÍGUEZ

ASESOR


FILIBERTO HERRERA CEDANO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Noviembre de 2013

DEDICATORIA

A mi madre. Por ayudarme siempre incondicionalmente y apoyarme para realizar mis estudios y crecer profesionalmente para ser mejor persona.

A mi señora Elizabeth Flores Torres. Por su enorme apoyo y ayuda para la realización de mis estudios, así como, por su esfuerzo, tiempo e infinita paciencia.

A mis hijos: Lizeth Jaqueline y Raúl Plascencia Flores. Por apoyarme en la realización de mis estudios y por seguirme para la obtención de mi grado.

A mi familia. Por apoyarme en la realización de mis estudios

AGRADECIMIENTOS

A Dios. Gracias, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

Dr. Adrián Raymundo Quero Carrillo. Por la aceptación, dirección, enseñanza de algunos de sus conocimientos y por su enorme paciencia para la realización de la presente tesis.

A mi Consejo Particular. Por el apoyo, la paciencia y esfuerzo extra en la revisión de la tesis.

Dr. Roberto Quintero Lizaola. Por su paciencia, enseñanza, asesoría para esta tesis.

Biol. Greta Hanako Rosas Saito. Unidad de Microscopía electrónica del CP. Por la asesoría en el procesamiento y observación de las imágenes en microscopio electrónico de barrido.

A todos los profesores que me impartieron clases. Por la oportunidad de obtener algunos de sus conocimientos, para incrementar la producción agrícola y pecuaria.

Al Colegio de Postgraduados. Por darme la oportunidad de obtener mayor conocimientos y crecer profesionalmente. A las Líneas Prioritarias de Investigación (LPI11 y LPI16), por su apoyo económico asertivo.

Dr. Sergio Aranda Ocampo. Por permitirme y tenerme confianza para trabajar en el laboratorio de bacteriología. MC. Juan Celestino Molina Moreno. Por su asesoría y por facilitarme las máquinas para el beneficio de la semilla que utilice en la presente tesis.

Al CONACyT. Por el apoyo económico para realizar mis estudios de maestría.

Al Dr. Filiberto Herrera Cedano. Por la ayuda, orientación y el apoyo para poder ingresar a la maestría.

Al INIFAP. Por darme la oportunidad de crecer profesionalmente.

ASOCIACIÓN DE CEPAS FIJADORAS DE NITRÓGENO DE VIDA LIBRE, CON RECURSOS GENÉTICOS DE PASTOS PARA ZONAS ÁRIDAS

Raúl Plascencia Jiménez, MC

Colegio de Postgraduados, 2013

RESUMEN GENERAL

Para evaluar microorganismos de la rizosfera de *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., se recolectó suelo de cinco localidades 1) Salinas, San Luis Potosí 2) Ejido, Jacalón, Salinas, San Luis Potosí; 3) Calera, Zacatecas; 4) Santa María del Oro, Durango y 5) Crucero La Zarca, Durango. La población de actinomicetos, bacterias y hongos, se estimó con diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-10}). Los actinomicetos (AS), bacterias (BS) y hongos (HS) se estimaron con diluciones 10^{-3} a 10^{-5} ; 10^{-5} a 10^{-7} ; 10^{-2} a 10^{-4} , respectivamente, con cinco repeticiones. Las siembras en placa se incubaron a 30 °C. Las unidades formadoras de colonias de bacterias (*ufc*) se cuantificaron a 24, 48 y 72 h; mientras que, para actinomicetos y hongos, las *ufc* se cuantificaron a 7, 8 y 9 d. En dos medios de cultivo, crecieron bacterias fijadoras de nitrógeno, las cuales se caracterizaron morfológicamente. Para determinar el efecto de la inoculación de bacterias sobre recursos forrajeros nativos, se evaluaron los tratamientos: cepa a66 (C1), I27 (C2), I95 (C3), S73 (C4) y ZA40 (C5), consorcio (C6), mezcla de las cepas anteriores y (C7) testigo, sin inoculación de bacteria. Se inocularon semillas, en prueba de germinación, para determinar asociatividad con el pasto; también, se inocularon dos genotipos de pasto (G1, La Zarca) y (G2, genotipo 5) para estimar el rendimiento de materia seca. Se encontraron poblaciones de AS con 4.2, 9.0, 5.1, 2.4 y 8.4 x 10^4 *ufc* g⁻¹ suelo seco⁻¹; para BS, de 0.5, 1.8, 1.9, 1.5 y 1.2x10⁵ *ufc* g⁻¹ suelo seco⁻¹; para HS de 0.1, 0.3, 0.2, 0.4 y 0.5x10³ *ufc* g⁻¹ suelo seco⁻¹ para las localidades 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. En la inoculación, se observaron diferencias ($P<0.01$) a 14 días después de la siembra (dds) 43, 34, 32, 33, 35, 39 y 78% de germinación en a66, I27, I95, S73, ZA40, Consorcio y testigo, respectivamente. En inoculación, las alturas para C1, C2, C3, C4, C5, C6 y C7 mostraron promedios de 28.4, 29.7, 32.0, 35.1, 30.9, 38.4 y 31.3cm, respectivamente. El consorcio fue el que presentó los mayores valores en germinación y altura de planta.

Palabras clave: *Bouteloua*, fijación de nitrógeno, forraje, inoculación

FREE LIVING BACTERIAL STRAINS ASSOCIATION CAPABILITY
WITH GRASS GENETIC RESOURCES, FOR ARID LANDS

Raúl Plascencia Jiménez, MC

Colegio de Postgraduados, 2013

GENERAL ABSTRACT

In order to evaluate rhizospheric microorganisms to *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., soil was collected from five locations 1) Salinas, San Luis Potosí; 2) Ejido, Jacalón, Salinas, San Luis Potosí; 3) Calera, Zacatecas; 4) Santa María del Oro, Durango; 5) La Zarca, Durango. The population of actinomycetes, bacteria and fungi, was estimated through serial decimal dilutions (10^{-1} a 10^{-10}). Actinomycetes (AS), bacteria (BS) and fungi (HS) were estimated through 10^{-3} to 10^{-5} ; 10^{-5} to 10^{-7} ; 10^{-2} to 10^{-4} dilutions, respectively with five replicates. Plating microorganisms were incubated at 30 °C. Bacterial colony forming units (*cfu*) were quantified at 24, 48 and 72 h; while actinomycetes and fungi, *cfu* were quantified 7, 8 and 9 d. Two culture media were used to increase nitrogen fixing bacteria, which were characterized morphologically. In order to define the inoculation effect of bacterial strains on native grasses, several microorganism strains were evaluated: a66 (C1), I27 (C2), I95 (C3), S73 (C4) and ZA40 (C5); consortium (C6), a mixture of all the strains, and (C7) as placebo. In order to define microorganism-plant associativity, germination test were evaluated through seed inoculation and two grass genotypes were inoculated: G1 (La Zarca) and G2 (Genotipo 5) for dry matter production. Populations of AS were detected with 4.2, 9.0, 5.1, 2.4 and 8.4 x 10^4 *cfu g*⁻¹ dry soil. For BS, detected levels were 0.5, 1.8, 1.9, 1.5 and 1.2x10⁵ *cfu g*⁻¹ dry soil; for HS, detected levels were 0.1, 0.3, 0.2, 0.4 and 0.5x10³ *cfu g*⁻¹ dry soil for sites 1, 2, 3, 4 and 5, respectively. Differences were detected for inoculation level ($P<0.01$) at 14 days after sowing (das) 43, 34, 32, 33, 35, 39 and 78% germination was registered for a66, I27, I95, S73, ZA40, consortium and control, respectively. Plants height was different ($P<0.01$) strains C1, C2, C3, C4, C5, C6, and C7 showed averages of 28.4, 29.7, 32.0, 35.1, 30.9, 38.4 and 31.3 cm, respectively. The consortium showed the highest values for germination and forage yield.

Key words: *Bouteloua*, nitrogen fixation, forage, inoculation

CONTENIDO

| | |
|---|------|
| ÍNDICE GENERAL..... | vii |
| ÍNDICE DE CUADROS..... | xi |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | xiii |
| ÍNDICE DE CUADROS EN APÉNDICE..... | xv |
| CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL..... | 1 |
| 1.1. Introducción..... | 1 |
| 1.2. Justificación..... | 2 |
| 1.3. Planteamiento del Problema..... | 2 |
| 1.4. Objetivos Generales..... | 3 |
| 1.5. Objetivos Específicos..... | 3 |
| 1.6. Hipótesis..... | 4 |
| 1.7. Literatura Citada..... | 4 |
| CAPÍTULO II. DIVERSIDAD POBLACIONAL DE MICROORGANISMOS DE LA RIZOSFERA, ASOCIADOS CON PASTOS NATIVOS, EN SUELOS DE REGIONES ÁRIDAS DE MÉXICO..... | 5 |
| 2.1. Revisión de Literatura..... | 6 |
| 2.1.1. Microorganismos de la rizosfera..... | 6 |
| 2.1.2. Actividad biótica del suelo..... | 7 |
| 2.1.3. Pastizales degradados..... | 8 |
| 2.1.4. Estabilidad ecológica de la pradera..... | 9 |
| 2.2. Materiales y Métodos..... | 9 |
| 2.2.1. Área de estudio..... | 9 |
| 2.2.2. Estudio de la población de microorganismos de la rizosfera de <i>Bouteloua curtipendula</i> (Michx.) Torr..... | 10 |
| 2.3. Análisis Estadístico..... | 11 |
| 2.4. Resultados y Discusión..... | 11 |
| 2.5. Conclusiones..... | 17 |
| 2.6. Literatura Citada..... | 17 |
| CAPÍTULO III. DIVERSIDAD GENÉTICA DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO DE VIDA LIBRE, EN SUELOS DE REGIONES ÁRIDAS, | |

| | |
|---|----|
| ASOCIADOS CON PASTOS NATIVOS DE MÉXICO..... | 23 |
| 3.1. Revisión de Literatura..... | 24 |
| 3.1.1. Fertilidad del suelo..... | 24 |
| 3.1.2. Fertilización química..... | 25 |
| 3.1.3. Importancia del Nitrógeno..... | 25 |
| 3.1.4. Ciclo del Nitrógeno..... | 25 |
| 3.1.5. Mineralización del Nitrógeno..... | 26 |
| 3.1.6. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal de vida libre..... | 27 |
| 3.1.7. Género <i>Azospirillum</i> spp..... | 28 |
| 3.1.8. Interacción suelo-planta-microorganismo..... | 29 |
| 3.1.9. Fijación biológica de Nitrógeno..... | 29 |
| 3.1.10. Reducción de acetileno..... | 30 |
| 3.1.11. Producción de Indoles..... | 30 |
| 3.2. Materiales y Métodos..... | 31 |
| 3.2.1. Área de estudio..... | 31 |
| 3.2.2. Evaluación de bacterias de la rizosfera de pasto Banderita, de las diferentes localidades..... | 31 |
| 3.2.3. Aislamiento y caracterización morfológica de bacterias fijadoras de Nitrógeno de vida libre, promotoras del crecimiento, de pasto Banderita..... | 32 |
| 3.2.4. Evaluación de la capacidad para fijar Nitrógeno de bacterias aisladas de la rizosfera de pasto Banderita, de diferentes localidades..... | 32 |
| 3.2.5. Caracterización de bacterias fijadoras de Nitrógeno de vida libre, mediante microscopía electrónica de barrido..... | 32 |
| 3.3. Análisis Estadístico..... | 33 |
| 3.4. Resultados y Discusión..... | 33 |
| 3.4.1. Población de bacterias..... | 33 |
| 3.4.2. Caracterización morfológica de bacterias fijadoras de Nitrógeno..... | 33 |
| 3.4.3. Caracterización de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, de vida libre, mediante microscopía electrónica de barrido..... | 33 |
| 3.5. Conclusiones..... | 38 |
| 3.6. Literatura Citada..... | 38 |

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO IV. INOCULACIÓN DE RECURSOS FORRAJEROS NATIVOS, CON CEPAS NATIVAS FIJADORAS DE NITRÓGENO DE VIDA LIBRE DE ZONAS ÁRIDAS DE MÉXICO..... | 43 |
| 4.1. Revisión de Literatura..... | 44 |
| 4.1.1. Importancia de los biofertilizantes..... | 44 |
| 4.1.2. Inoculación con bacterias..... | 45 |
| 4.1.3. Evaluación de semilla inoculada..... | 45 |
| 4.1.4. Evaluación en plántula inoculada..... | 46 |
| 4.1.5. Rendimiento de biomasa con cepas inoculadas..... | 46 |
| 4.1.6. Recursos genéticos forrajeros nativos..... | 46 |
| 4.1.7. Tasa de crecimiento del cultivo..... | 47 |
| 4.2. Materiales y Métodos..... | 47 |
| 4.2.1. Pruebas para determinar calidad física de semilla..... | 47 |
| 4.2.1.1. contenido de humedad..... | 47 |
| 4.2.1.2. pureza física..... | 48 |
| 4.2.1.3. peso de 1000 semillas..... | 48 |
| 4.2.1.4. peso volumétrico..... | 48 |
| 4.2.2. Ensayo de germinación..... | 48 |
| 4.2.2.1. obtención de inóculo con bacterias promotoras de crecimiento vegetal..... | 48 |
| 4.2.2.2. desinfección de semilla..... | 49 |
| 4.2.2.3. pruebas para determinar calidad fisiológica de semilla: Germinación estándar..... | 49 |
| 4.2.2.4. tratamientos..... | 49 |
| 4.2.2.5. índice de germinación..... | 50 |
| 4.2.2.6. análisis de información para germinación..... | 50 |
| 4.2.3. Rendimiento de biomasa en pasto Banderita, inoculado con bacterias fijadoras de Nitrógeno de vida libre..... | 50 |
| 4.2.3.1. obtención de inoculante..... | 50 |
| 4.2.3.2. tratamientos..... | 50 |
| 4.2.3.3. inoculación de cepas promotoras del crecimiento vegetal..... | 51 |
| 4.2.3.4. análisis de información..... | 51 |

| | |
|---|----|
| 4.2.4. Tasa de crecimiento del forraje..... | 51 |
| 4.3. Resultados y Discusión..... | 51 |
| 4.3.1. Pruebas de calidad física de semilla..... | 51 |
| 4.3.1.1. prueba de calidad física de semilla en germinación..... | 51 |
| 4.3.1.2. prueba de calidad física de semilla en ensayo de plántulas..... | 52 |
| 4.3.2. Efecto de la inoculación en la germinación de pasto Banderita..... | 52 |
| 4.3.3. Efecto de la inoculación en rendimiento de biomasa..... | 62 |
| 4.3.3.1 altura de planta en pasto Banderita, inoculado con bacterias de vida libre..... | 62 |
| 4.3.3.2. rendimiento de biomasa de pasto Banderita..... | 68 |
| 4.3.4. Tasa de crecimiento del forraje..... | 81 |
| 4.4. Conclusiones..... | 84 |
| 4.5. Literatura Citada..... | 85 |
| CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES..... | 90 |
| CAPÍTULO VI. APÉNDICE..... | 91 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 2.1. Características geográficas de localidades de muestreo de la rizosfera..... | 9 |
| Cuadro 2.2. Características químicas del suelo de las localidades consideradas..... | 10 |
| Cuadro 2.3. Características físicas del suelo, contenido de humedad y conteo en placa, de microorganismos aislados de la rizosfera de <i>Bouteloua curtipendula</i> (Michx.) Torr..... | 12 |
| Cuadro 2.4. Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre microorganismos y características del suelo donde se realizaron los muestreos..... | 16 |
| Cuadro 4.1. Características físicas y químicas del suelo utilizado en experimento de plántulas..... | 62 |
| Cuadro 4.2. Efecto de la interacción genotipos por cepas, en altura de la planta, en las diferentes fechas de muestreo..... | 65 |
| Cuadro 4.3. Efecto de la interacción dosis de inoculación por cepa evaluada, para altura de planta, en las diferentes fechas de muestreo..... | 66 |
| Cuadro 4.4. Interacción genotipos por cepas por dosis de inoculación sobre altura de planta, en las diferentes fechas de muestreo..... | 67 |
| Cuadro 4.5. Producción de peso seco de la parte aérea, en genotipos evaluados, como respuesta a la cepa utilizada..... | 70 |
| Cuadro 4.6. Efecto de la interacción genotipos por cepas evaluadas sobre el peso seco aéreo, en los diferentes muestreos..... | 72 |
| Cuadro 4.7. Rendimiento de peso seco aéreo con la interacción dosis de inoculación por cepa evaluada, en las diferentes fechas de muestreo..... | 73 |
| Cuadro 4.8. Efecto de la interacción genotipos por cepas evaluadas por dosis de inoculación sobre el rendimiento de forraje de la parte aérea..... | 74 |
| Cuadro 4.9. Peso seco de la raíz en las diferentes cepas evaluadas y diversas fechas de muestreos destructivos..... | 77 |
| Cuadro 4.10. Efecto de la interacción genotipo por cepa sobre el peso seco de raíz en las diferentes fechas de muestreo..... | 79 |
| Cuadro 4.11. Efecto de la interacción dosis de inoculación por cepa evaluada en las diferentes fechas de muestreo..... | 80 |
| Cuadro 4.12. Efecto de la interacción de genotipos por cepa por dosis de inoculación | |

| | |
|--|----|
| sobre PSR en los diferentes muestreos destructivos..... | 81 |
| Cuadro 4.13. Tasa de crecimiento del cultivo de la parte aérea con las diferentes cepas evaluadas y diversas fechas de muestreos destructivos..... | 83 |
| Cuadro 4.14. Tasa de crecimiento del cultivo de la raíz con las diferentes cepas evaluadas y diversas fechas de muestreos destructivos..... | 84 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 2.1. Población de microorganismos de diferentes localidades evaluadas..... | 14 |
| Figura 3.1. Ciclo de Nitrógeno..... | 26 |
| Figura 3.2. Características de la Cepa a66 observada en microscopio de barrido. 3.2A, bacterias a 2000x y 3.2B, a 5000x..... | 34 |
| Figura 3.3. Caracterización en microscopio electrónico de la Cepa a66. 3.3A y 3.3B, a 5000x y 3.3C y 3.3D a 8000x..... | 34 |
| Figura 3.4. Características de la Cepa I27 observada en microscopio de barrido. 3.4A y 3.4B, las bacterias se observaron a 5000x y 8000x, respectivamente..... | 35 |
| Figura 3.5. Caracterización en microscopio electrónico de la Cepa I95. 3.5A y 3.5B, las bacterias se observaron a 8000x y 5000x, respectivamente..... | 35 |
| Figura 3.6. Caracterización en microscopio electrónico de la Cepa S73. 3.6A, las bacterias se observaron a 2000x; en 3.6B y 3.6C, se observaron a 5000x y en 3.6D, se observaron a 8000x..... | 36 |
| Figura 3.7. Características de la Cepa ZA40 observada en microscopio de barrido. 3.7A, las bacterias se observaron a 2000x y, en 3.7B, a 5000x | 37 |
| Figura 3.8. Caracterización en microscopio electrónico de la Cepa ZA40. 3.8A y 3.8B, las bacterias se observaron a 5000x y 8000x, respectivamente..... | 37 |
| Figura 4.1. Calidad física de la semilla en ensayo de plántulas..... | 52 |
| Figura 4.2. Germinación, por cepa evaluada, a 7 días después de la siembra..... | 53 |
| Figura 4.3. Efecto de dosis de inoculación en la germinación de semilla a 7 días después de la siembra..... | 53 |
| Figura 4.4. Efecto de la interacción cepa por dosis de inoculación, en la germinación a 7 días después de la siembra en pasto Banderita..... | 54 |
| Figura 4.5. Evaluación de cepas a 14 días después de la siembra para germinación de pasto Banderita..... | 55 |
| Figura 4.6. Efecto de la dosis inoculada, en la germinación, a 14 días después de la siembra..... | 56 |
| Figura 4.7. Efecto de la interacción cepa por dosis de inoculación a 14 días después de la | |

| | |
|--|----|
| siembra..... | 57 |
| Figura 4.8. Índice de germinación por cepa evaluada a 7 y 14 días después de la siembra..... | 58 |
| Figura 4.9. Índice de germinación por dosis evaluada a 7 y 14 días después de la siembra..... | 59 |
| Figura 4.10. Efecto de interacción cepa por dosis de inóculo sobre el índice de germinación a 7 días después de la siembra..... | 60 |
| Figura 4.11. Efecto de la interacción cepa por dosis de inóculo en el índice de germinación a 14 días después de la siembra..... | 61 |
| Figura 4.12. Altura de planta en dos genotipos evaluados en diferentes fechas de muestreo..... | 63 |
| Figura 4.13. Altura de planta por cepa evaluada..... | 63 |
| Figura 4.14. Efecto de la interacción genotipo por dosis de aplicación en altura de planta..... | 64 |
| Figura 4.15. Peso seco de la parte aérea (PSA) de dos genotipos y por fecha de muestreo..... | 69 |
| Figura 4.16. Efecto de la interacción genotipo por dosis de aplicación sobre peso seco de la parte aérea (PSA)..... | 71 |
| Figura 4.17. Peso seco de raíz (PSR) de dos genotipos evaluados por fecha de muestreo..... | 75 |
| Figura 4.18. Peso seco de raíz (PSR) de las dosis de inoculación evaluadas por fechas de muestreo..... | 76 |
| Figura 4.19. Efecto de la interacción genotipo por dosis de aplicación sobre peso seco de raíz (PSR)..... | 78 |
| Figura 4.20. Tasa de crecimiento del cultivo de la parte aérea en dos genotipos evaluados por fecha de muestreo..... | 82 |
| Figura 4.21. Tasa de crecimiento del cultivo de la raíz en dos genotipos evaluados por fecha de muestreo..... | 83 |

ÍNDICE DE CUADROS EN EL APÉNDICE

| | |
|---|----|
| Cuadro A1. Características morfológicas de bacterias desarrolladas en placa..... | 91 |
| Cuadro A2. Medio NFb para el género <i>Azospirillum</i> | 91 |
| Cuadro A3. Medio de cultivo Rojo Congo..... | 92 |
| Cuadro A4. Características morfológicas de colonias aisladas para cinco localidades evaluadas..... | 93 |
| Cuadro A5. Escala de McFarland..... | 95 |

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Introducción

Actualmente, los recursos genéticos forrajeros nativos se están perdiendo aceleradamente a consecuencia de la presión de uso ejercida sobre los pastizales áridos de México y no existen estudios sistemáticos para su aprovechamiento; similarmente, existe amplio desconocimiento sobre su impacto en los sistemas de producción. Los recursos forrajeros nativos contienen individuos con características específicas sobresalientes y amplia adaptabilidad a condiciones ambientales prevalecientes: sequía, temperaturas invernales, limitada precipitación, entre otros aspectos; por ello, es importante seleccionar, conservar, caracterizar y conocer el potencial productivo de la riqueza genética disponible de pastos para su utilización en los sistemas de producción. Esta amplia diversidad genética contiene oportunidades (relaciones alélicas desconocidas) que pueden ser de beneficio para el sector agropecuario y responder a la demanda del sector y nuevos retos: cambio climático y conservación saludable del ecosistema. Por otra parte, los ecosistemas de temporal bajo pastoreo adolecen consuetudinariamente de nutrientes para el desarrollo adecuado de las plantas, siendo el N y P los principales elementos limitantes de la producción. La principal vía de incorporación de Nitrógeno al ecosistema ocurre mediante la fijación biológica y el reciclado de nutrientes por organismos denitrificadores desde el suelo hacia la atmosfera de forma constante (Baca *et al.*, 2000).

En el suelo existe gran diversidad de microorganismos que contribuyen a mantener la vida en el planeta; por tanto, es importante estudiar, identificar y caracterizar su diversidad, porque conforman comunidades complejas con nichos específicos y muestran interacción con las propiedades del suelo y actividad de la planta; lo anterior, para evitar problemas que pudieran inhibir la proliferación de microorganismos benéficos del suelo. El estudio del comportamiento de bacterias y hongos mediante exudados vegetales, es uno de los principios básicos para conocer la interacción planta-microorganismo. Brasil *et al.* (2005), mencionan que *Azospirillum* tiene especial afinidad por raíces de gramíneas, que responden con incrementos en crecimiento y rendimiento cuando son inoculadas. La secreción de sustancias vegetales promotoras del crecimiento: auxinas, giberelinas y citoquininas, por *Azospirillum*, parecen estar involucradas parcialmente en la respuesta de la asociación gramínea-bacteria (Reis-Junior *et al.*, 2004; Radwan *et al.*, 2005; Kuss *et al.*, 2007).

1.2. Justificación

Los microorganismos cumplen funciones importantes en el suelo y su dinámica poblacional está en función de las especies vegetales presentes, clima y suelo. Los estudios en poblaciones de microorganismos se han realizado en cultivos de importancia económica; sin embargo, en pastizales, es importante cuantificar, caracterizar y promover microorganismos benéficos y promotores del crecimiento vegetal. La amplia variabilidad intraespecífica y el acceso a recursos genéticos de especies valiosas para pastoreo en zonas áridas constituye la materia prima para responder a las necesidades de los sistemas de producción dinámicos en diversos aspectos limitativos de éstos (Rice, 2007): resistencia a sequía, producción y calidad de forraje, resistencia al pastoreo, senescencia, fijación de Nitrógeno, etc.

Diversos trabajos han señalado la importancia de la fijación biológica de Nitrógeno en gramíneas y su potencial de aplicación en condiciones de producción; sin embargo, en México no existen indicios del comportamiento de las cepas disponibles, de la capacidad de asociación con gramíneas forrajeras nativas y de la respuesta productiva de esta asociación. Por ello, es importante aislar, caracterizar e identificar bacterias fijadoras de Nitrógeno de vida libre y promotoras del crecimiento vegetal para integrar este factor limitante al sistema, disminuir la utilización de fertilizante inorgánico y minimizar la contaminación de mantos acuíferos. La información que se tiene sobre la respuesta de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el establecimiento de gramíneas forrajeras en zonas áridas y semiáridas es escasa; además, son limitados los estudios sobre las bacterias que se asocian con las plantas de forma natural en condiciones de estrés hídrico (Loredo-Osti *et al.*, 2004).

1.3. Planteamiento del Problema

México cuenta con gran diversidad de recursos forrajeros nativos y las gramíneas no son la excepción; sin embargo, los recursos genéticos de estas últimas se están perdiendo debido al abuso del pastoreo y al hecho de que los productores desconocen el potencial productivo que pueden alcanzar bajo un buen manejo. El género *Bouteloua* incluye gramíneas nativas de regiones áridas y semiáridas de México con gran diversidad morfológica y, sus aptitudes, incluyen resistencia a heladas y sequía, desafortunadamente este recurso se está degradando por el sobrepastoreo, lo que ocasiona reducción de los parámetros productivos del hato, además de desequilibrio en el ecosistema: mayor erosión (física y genética), pérdida acelerada

de nutrientes esenciales para el crecimiento vegetal. Uno de los nutrientes que requieren las plantas para su crecimiento es el Nitrógeno y, por su alto costo, los productores no invierten en comprar fertilizante para aplicar a sus pastizales. Por otro lado, la pérdida de fertilidad del suelo está acompañada por degradación del pastizal; además, causa ineficiencia económica, por lo tanto, existe amenaza ecológica para las áreas ganaderas. Actualmente, los pastizales degradados sobrepasan 650 millones de has en el mundo (Padilla *et al.*, 2009).

El uso inadecuado de los sistemas de pastoreo ocasiona que los pastizales se degraden disminuyendo la fertilidad del suelo, limitando la disponibilidad de nutrientes para las plantas, presentándose un desequilibrio en el ecosistema. Una alternativa para que los productores conserven sus pastizales en condiciones óptimas es que utilicen la asociación de bacterias fijadoras de Nitrógeno de vida libre con pastos del género *Bouteloua* para incrementar la fijación de Nitrógeno atmosférico e incrementar la producción de forraje y, como consecuencia, aumentar los indicadores productivos de los animales de su sistema de producción.

1.4. Objetivos Generales

Caracterizar recursos genéticos disponibles de *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., en capacidad de asociación con cepas fijadoras de Nitrógeno de vida libre.

Caracterizar la colecta de cepas fijadoras de Nitrógeno de vida libre, en respuesta asociativa con *B. curtipendula* (Michx.) Torr.

1.5. Objetivos Específicos

Evaluar la diversidad de poblaciones de microorganismos presentes en la rizosfera de pastos nativos de zonas áridas de México.

Determinar las características morfológicas de las cepas seleccionadas para la producción de inóculo.

Evaluar la calidad fisiológica de semilla inoculada con cepas de vida libre fijadoras de Nitrógeno y promotoras del crecimiento vegetal.

Comparar el comportamiento productivo de ecotipos de *B. curtipendula* (Michx.) Torr., asociados con cepas efectivas fijadoras de Nitrógeno de vida libre.

1.6. Hipótesis

Todas las cepas fijadoras de Nitrógeno de vida libre se asocian efectivamente con *B. curtipendula* (Michx.) Torr.

No hay diferencia en la fijación de Nitrógeno en las diferentes cepas evaluadas

La producción de Indoles es similar en las cepas y genotipos evaluados.

Las cepas se asocian con todos los ecotipos de *B. curtipendula* (Michx.) Torr.

Todos los ecotipos asociados con las cepas fijadoras de Nitrógeno de vida libre producen la misma cantidad de forraje.

1.7. Literatura Citada

- Baca, B. E., L. Soto, M. P. Pardo. 2000. Fijación biológica de nitrógeno. Elementos 38:43-49.
- Brasil, M. S., J. I. Baldani, V. L. D. Baldani. 2005. Occurrence and diversity of diazotrophic bacteria associated to forage grasses of the Pantanal in the State of Mato Grosso do Sul. Rev. Bras. Cienc. Solo 29(2): 179-190.
- Kuss, A. V., V. V. Kuss, T. Lovato y M. L. Flores. 2007. Nitrogen fixation and *in vitro* production of indolacetic acid by endophytic diazotrophic bacteria. Pesq. Agropec. Bras. 42(10): 1459-1465.
- Loredo-Osti, C., L. López-Reyes y D. Espinosa-Victoria. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: una revisión. Terra Latinoamericana. 22(2): 225-239.
- Padilla, C., G. Crespo y Y. Sardiñas. 2009. Degradación y recuperación de pastizales. Revista Cubana de Ciencias Agrícolas 43(4): 351-354.
- Radwan, T. E. E., Z. K. Mohamed y V. M. Reis. 2005. Aeration and salt effects on indol acetic production by diazotrophic bacteria. Pesq. Agropec. Bras. 40(10): 997-1004.
- Reis-Junior, F. B., M. F. Silva, K. R. S. Teixeira, S. Urquiaga y V. M. Reis. 2004. Identification of *Azospirillum amazonense* isolates associated to *Brachiaria* spp. at different stages and growth conditions, and bacterial plant hormone production. Rev. Bras. Cienc. Solo 28(1): 103-113.
- Rice, E. 2007. Conservation in a changing world: *in situ* conservation of the giant maize of Jala. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54(4):701-713.

CAPÍTULO II. DIVERSIDAD POBLACIONAL DE MICROORGANISMOS DE LA RIZOSFERA, ASOCIADOS CON PASTOS NATIVOS, EN SUELOS DE REGIONES ÁRIDAS DE MÉXICO

Resumen

La mayoría de las investigaciones realizadas sobre las comunidades microbianas, se han desarrollado en cultivos básicos y no existe información relacionada con la interacción que pudieran tener las poblaciones de microorganismos de la rizosfera en el rendimiento de pastos del agostadero. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la diversidad de poblaciones de microorganismos presentes en la rizosfera de pastos nativos de zonas áridas de México. El experimento se realizó en el área de Bacteriología del Programa de Fitopatología, del *Campus* “Montecillo” del Colegio de Postgraduados, Km 36.5 de la carretera México- Texcoco, en el municipio de Texcoco, Estado de México (19° 27' Norte y 98° 54' Oeste), a una altitud de 2220 m, clima Cw, el menos seco de los áridos con lluvias en verano, temperatura media anual de 14.6 °C y precipitación media anual de 500 mm. Se colectó suelo rizosférico de cinco localidades. Para evaluar la población de microorganismos presentes en pasto Banderita *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., se recolectó suelo de cinco localidades [1) Salinas, San Luis Potosí; 2) Ejido, Jacalón, Salinas, San Luis Potosí; 3) Calera, Zacatecas; 4) Santa María del Oro, Durango; y 5) Crucero La Zarca, Durango], donde existen praderas naturales de este pasto, dicho suelo se tamizó en malla de 2 mm hasta obtener 1 kg de suelo, del cual se tomó una submuestra de 100 g para determinar las características físicas y químicas del mismo. Otros 10 g fueron empleados para determinar contenido de humedad; 10 g, bajo condiciones de asepsia, se vertieron en botella de dilución con 90 ml de agua destilada estéril, la cual se agitó vigorosamente durante 2 min y de esta dilución (10^{-1}), se tomaron 10 ml, realizando diluciones a diez decimales (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} y 10^{-10}). Para determinar la población de actinomicetos, bacterias y hongos, se utilizaron las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} ; 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , respectivamente, a partir de las cuales, se tomaron alícuotas de 0.1 ml que se vertieron sobre placa y, mediante varilla de vidrio, se distribuyeron uniformemente, incubándose a 30 °C, en cinco repeticiones por dilución. Las unidades formadoras de colonias de bacterias (*ufc*) se cuantificaron a 24, 48 y 72 h; mientras que, para actinomicetos y hongos las *ufc* se cuantificaron a 7, 8 y 9 d. Se encontraron poblaciones de actinomicetos de 4.2, 9.0, 5.1, 2.4 y 8.4 x 10^4 g suelo seco⁻¹; para bacterias, se obtuvieron

poblaciones de 0.5, 1.8, 1.9, 1.5 y 1.2 x 10⁵ g suelo seco⁻¹; para hongos, se observaron poblaciones de 0.1, 0.3, 0.2, 0.4 y 0.5 x 10³ g suelo seco⁻¹ para las localidades 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. Se observó una correlación entre la población de hongos con localidad y MO presente en el suelo. Existe gran diversidad de microorganismos nativos con potencial para generar inoculantes microbianos, incrementar la producción de forraje y minimizar la utilización de fertilizantes químicos en condiciones de temporal de zonas áridas. Las poblaciones reportadas son nativas de las regiones áridas y semiáridas y juegan un papel importante para el aprovechamiento sustentable de los recursos vegetales nativos. Tanto el tipo de suelo, MO, CE y N presentes, influyen la dinámica poblacional de comunidades de microorganismos presentes en la rizosfera.

2.1. Revisión de Literatura

2.1.1. Microorganismos de la rizosfera

En la rizosfera existe gran diversidad de microorganismos que forman comunidades complejas, las cuales contribuyen a mantener la fertilidad del suelo. Los microorganismos interactúan mediante exudados radicales que liberan las plantas, los cuales, definen la dinámica de los mismos en la rizosfera. Buyer y Kaufman (1996), Kuske *et al.* (2002), Widmer *et al.* (2006), Cavaglieri *et al.* (2009), Tian *et al.* (2009), Martínez *et al.* (2010), mencionan que los microorganismos juegan un papel importante para mantener el ciclo de nutrientes, características del suelo, procesos de transformación, productividad primaria y la promoción del crecimiento vegetal; sin embargo, las poblaciones de éstos, se ven afectadas por variaciones del ambiente. Uno de los principios básicos para el estudio de los microorganismos es mediante exudados radicales, fuente de alimentación de microorganismos e interacción planta-microorganismos (Alarcón y Ferrera, 2000; Escalante-Lozada *et al.*, 2004; Soroa-Bell *et al.*, 2009; Hollister *et al.*, 2010). Hernández *et al.* (2001), señalan que entre plantas y microorganismos de la rizosfera existe una relación debida a la liberación de compuestos nutritivos generados por la fotosíntesis; los cuales, son trasladados a las raíces en forma de exudados, secreciones y mucilagos, estas interacciones son determinadas por dos factores importantes (Nehl *et al.*, 1996; Gesheva, 2002; Singh *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Garbeva *et al.*, 2008; Ambrosini *et al.*, 2012): especie vegetal y tipo de suelo, así como contenido de humedad del mismo, promoviendo el crecimiento radical (Adesemoye *et al.*,

2009; Richardson *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2011). Sant'Anna *et al.* (2011), señalan que la rizosfera es ejemplo de hábitat con entorno dinámico y grandes fluctuaciones en actividad biológica y química. A pesar de la importancia que tienen los microorganismos en la rizosfera, el beneficio de forma natural es insignificante, ésto se debe al mal manejo en los sistemas de producción agrícola y pecuaria. Celaya-Michel y Castellanos (2011), mencionan que en suelo hay gran diversidad de microorganismos, tales como, bacterias, protozoarios, nematodos, ácaros y hongos, los cuales están involucrados en la descomposición de MO del suelo; además, con la depredación entre ellos, se liberan nutrientes que son reutilizados en la transformación y mineralización.

2.1.2. Actividad biótica del suelo

Es importante comprender la interacción de factores abióticos y bióticos de la fauna del suelo en diferentes escalas y regiones para minimizar los efectos negativos en las funciones del ecosistema (Birkhofer *et al.*, 2011). Stromberger *et al.* (2011), mencionan que es urgente conocer la actividad microbiana para identificar parámetros que predicen modelos del ecosistema para servicios del mismo. En agroecosistemas de secano, la comunidad microbiana se puede aumentar con tecnología alternativa, mediante retención de residuos de cultivos y reservas de nutrientes, mejorar estructura del suelo y, como consecuencia, mayor retención de agua. Aunado a ésto Sanaullah *et al.* (2011), evaluaron el efecto de la sequía sobre la actividad microbiana de la rizosfera de una comunidad de pastizal y encontraron que la sequía afecta el crecimiento radical y aéreo vegetal; además, la composición de la comunidad vegetal es modificada por la sequía, la presencia de pastos en monocultivo o en asociación con leguminosas en los ecosistemas de pastizal pueden reducir los efectos de la sequía, incrementando el secuestro de carbono, por tal motivo, la utilización de esta herramienta, puede reducir el estrés hídrico, al aumentar la eficiencia en el uso de agua por las plantas y su efecto en los ciclos de carbono y Nitrógeno por la actividad microbiana del suelo. Por otro lado Beare *et al.* (1997), señalan que la actividad microbiana juega un papel importante en la descomposición de desechos agrícolas y animales, regulando la estructura y función de los ecosistemas agrícolas; por otro lado, el desarrollo en el manejo de prácticas agrícolas sustentables promueve los atributos benéficos de los microorganismos, manteniendo la productividad y la integridad del medio ambiente en regiones tropicales. Grageda-Cabrera *et*

al. (2012), señalan que los microorganismos empleados como biofertilizante tienen un papel sustancial al practicar una agricultura conservacionista; para ello, el desarrollo y uso de biofertilizantes es una alternativa importante para sustituir parcial o totalmente el uso de fertilizantes químicos. Espinosa *et al.* (2011), indican que el suelo sin disturbio se mantiene en equilibrio dinámico con el ambiente, con alta interacción con la biosfera, produciendo altas cantidades de macro y microfauna. Además, mencionan que la actividad biótica cambia las propiedades del suelo, que mantienen fauna específica. Sin embargo, la degradación del suelo tiene como consecuencia cambios adversos en las propiedades y procesos; con el tiempo, éstos pueden desestabilizar el equilibrio dinámico del suelo con el ambiente por perturbación natural y antrópica, siendo esta última la de mayor consecuencia, puesto que es rápida y resulta en desequilibrio en las propiedades y los procesos del suelo (Espinosa *et al.*, 2011).

2.1.3. Pastizales degradados

La degradación de los pastizales va acompañada por baja fertilidad del suelo, provocando pérdidas económicas por la baja productividad del ganado. Los pastizales degradados se consideran así porque las especies deseables pierden vigor y capacidad productiva por unidad de área y animal, ocupando su lugar especies indeseables de bajo valor nutricional (Padilla *et al.*, 2009). Padilla y Cino (2003), indican que la aplicación de fertilizante nitrogenado ayuda a la recuperación de praderas. Por otra parte Yong *et al.* (2004; 2005), mencionan que el pastoreo abusivo acelera la erosión del suelo deteriorando las propiedades biológicas, contenido de C, N y P. La reducción en cobertura vegetal incrementa escorrentías, disminuye la capacidad de infiltración y aumenta la degradación de suelos en áreas de secano (Carmona *et al.*, 2013). Espinosa *et al.* (2011), mencionan que los tipos dominantes de degradación del suelo incluyen: erosión hídrica, compactación, erosión eólica y señalan como causas principales al sobrepastoreo y prácticas agrícolas superficiales. Celaya-Michel y Castellanos-Villegas (2011), argumentan que el hombre ocasiona perturbación de los ecosistemas en pro de su utilización, rompiendo el equilibrio en procesos del suelo; así mismo, en su capacidad de regulación y reciclaje de MO y nutrientes, además de ocasionar pérdida de Nitrógeno y fertilidad del suelo.

2.1.4. Estabilidad ecológica de la pradera

Es esencial entender los efectos del manejo de la comunidad microbiana en presencia de plagas, fertilidad del suelo a largo plazo y sustentabilidad en los sistemas de producción (Wakelin *et al.*, 2009). Al incrementar la biomasa y actividad microbiana, se pueden tener beneficios como formación de agregados, estabilidad del suelo, incremento en la descomposición de la MO, aceleración en los ciclos de nutrientes, su transformación, almacenamiento, liberación lenta de nutrientes orgánicos y control de patógenos (Carpenter-Boggs *et al.*, 2003). Prieto *et al.* (2011), señalan que el pastoreo afecta parámetros del suelo de forma directa: pisoteo, orina e indirecta: cobertura de forraje.

La mayoría de las investigaciones realizadas sobre las comunidades microbianas se han desarrollado en cultivos básicos y no existe información relacionada con la interacción y efecto que pudieran tener éstas en el rendimiento de pastos del agostadero. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la diversidad de poblaciones de microorganismos presentes en la rizosfera de pastos nativos de zonas áridas de México.

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Área de estudio

El experimento se realizó en el área de Bacteriología del Programa de Fitopatología, del *Campus* Montecillo del Colegio de Postgraduados, Km 36.5, carretera México-Texcoco, Texcoco, Estado de México (19° 27' Norte y 98° 54' Oeste), a una altitud de 2220 m, clima Cw, el menos seco de los áridos, con lluvias en verano, temperatura media anual de 14.6 °C y precipitación media anual de 500mm (García, 2005).

Cuadro 2.1. Características geográficas de localidades de muestreo de la rizosfera.

| Localidades | Lat. N | Long. O | A (m) | T °C | P mm | Clima |
|---------------------------|---------|----------|-------|-------|---------|---------------|
| Salinas, SLP (1) | 22° 38' | 101° 43' | 2070 | 14-18 | 300-500 | Seco templado |
| Jacalón, Salinas, SLP (2) | 22° 38' | 101° 43' | 2070 | 14-18 | 300-500 | Seco templado |
| Calera, Zacatecas (3) | 23° 27' | 102° 55' | 2160 | 16-18 | 400-500 | Seco templado |
| Sta. Ma. del Oro, Dgo (4) | 25° 57' | 105° 22' | 1700 | 10-20 | 300-600 | Seco templado |
| La Zarca, Dgo (5) | 26° 15' | 104° 55' | 1700 | 14-20 | 300-600 | Seco templado |

A=Altitud sobre el nivel del mar, T=Temperatura media anual, P=Precipitación media anual (INEGI, 2005).

Se colectaron muestras de cinco localidades (Cuadro 2.1). En cada localidad, donde se desarrolla de forma natural *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., se tomaron muestras de suelo de la rizosfera; el cual, se tamizó en malla de 2 mm hasta obtener 1 kg y se pesaron 100 g para determinar las características físicas y químicas del mismo (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2. Características químicas del suelo de las localidades consideradas.

| Características químicas del suelo | Localidades | | | | |
|--|-------------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| pH (H ₂ O) | 7.60 | 8.10 | 7.90 | 5.70 | 7.90 |
| MO (%) | 0.90 | 1.90 | 2.10 | 1.70 | 5.60 |
| CE (dS m ⁻¹) | 0.11 | 0.37 | 0.30 | 0.15 | 0.42 |
| CIC (meq 100g ⁻¹) | 14.0 | 32.9 | 28.4 | 18.4 | 18.9 |
| N (%) | 0.50 | 0.10 | 0.11 | 0.09 | 0.28 |
| P (mg kg ⁻¹) | 7.0 | 24.0 | 31.0 | 15.0 | 14.0 |
| K (mg kg ⁻¹) | 2.1 | 3.9 | 2.4 | 1.3 | 1.1 |
| N-NO ₃ (mg kg ⁻¹) | 11.0 | 46.0 | 28.0 | 25.0 | 32.0 |
| N-NH ₄ (mg kg ⁻¹) | 1.0 | 2.0 | 19.0 | 23.0 | 31.0 |

Localidades. 1) Salinas, San Luis Potosí, 2) Ejido, Jacalón, Salinas, San Luis Potosí, 3) Calera, Zacatecas, 4) Santa María del Oro, Durango, 5) Crucero La Zarca, Durango.

2.2.2. Estudio de la población de microorganismos de la rizosfera de *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.

Para estimar las poblaciones de actinomicetos, bacterias totales y hongos en cada localidad, se pesaron por duplicado 20 g de suelo rizosférico. Los primeros 10 g fueron empleados para determinar contenido de humedad, mediante secado en horno de convección mecánica a 110 °C, durante 24 h (Bewley y Black, 1994). Con los 10 g restantes, bajo condiciones de asepsia, se vertieron en botella de dilución con 90 ml de agua destilada estéril; la cual, se agitó vigorosamente durante 2 min y de esta dilución (10⁻¹), se tomaron 10 ml, realizando diluciones seriadas a diez decimales (10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹ y 10⁻¹⁰). Para determinar la población de actinomicetos se utilizaron las diluciones 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵ en medio Czapek gelificado (50 g l⁻¹), tomando cinco alícuotas de 0.1 ml, por dilución y distribuidos uniformemente por toda la placa. Para bacterias totales, se tomó de las diluciones 10⁻⁵, 10⁻⁶ y 10⁻⁷ una alícuota de 0.1 ml y sobre placas con Agar Nutritivo (20 g l⁻¹: 5 g l⁻¹ de Peptona de

Carne, 3 g l⁻¹ de Extracto de Carne y 12 g l⁻¹ de Agar-Agar) y se prepararon cinco repeticiones por dilución y, para hongos, se tomó una alícuota de 0.1 ml de las diluciones 10⁻², 10⁻³ y 10⁻⁴, utilizando Papa Dextrosa Agar gelificado (39 g l⁻¹), con cinco repeticiones por dilución. Las siembras en placa se incubaron a 30 °C. Las unidades formadoras de colonias de bacterias (*ufc*) se cuantificaron a 24, 48 y 72 h; mientras que, para actinomicetos y hongos las *ufc* se cuantificaron a 168, 192 y 216 h.

2.3. Análisis Estadístico

Los datos se analizaron mediante diseño completamente al azar, empleando GLM y Tukey ($P < 0.05$) para comparar medias entre tratamientos (SAS, 2003). Se realizó correlación de Pearson (r) entre la población de microorganismos y características químicas del suelo.

2.4. Resultados y Discusión

Las localidades uno y dos tienen la misma altitud, temperatura y precipitación; de igual forma, las localidades cuatro y cinco mostraron valores similares en altitud, temperatura y precipitación. La localidad tres tiene la mayor altitud comparado con las demás localidades. El pH de los suelos evaluados osciló desde moderadamente ácido hasta medianamente alcalino; sin embargo, la mayoría se consideran suelos alcalinos (Cuadro 2.2). El rango en contenido de MO fue desde bajo hasta alto. Para CE los valores en todas las localidades se consideran no salinos aptos para la agricultura. Para CIC las localidades uno, cuatro y cinco presentaron moderada capacidad de intercambio; sin embargo, las localidades dos y tres, mostraron la mayor tasa de intercambio de cationes cuyo rango fue alto. Los valores para N se consideran de bajos a muy altos, las localidades uno y cinco presentaron los mayores valores. Se encontró variación para Fósforo en las diferentes localidades cuyos niveles van de medio a alto. Sin embargo, se observó que los suelos de las localidades cuatro y cinco presentaron valores similares de Fósforo. Además, la localidad uno fue la única que presentó valores medios de Fósforo. Por otro lado, los niveles de Potasio son óptimos en las diferentes localidades. Para N-NO₃ los valores se consideran de bajos a aceptables. La localidad cuatro fue la que presentó, en la mayoría de las características químicas del suelo, los menores valores (Rodríguez y Rodríguez, 2011; NOM-021-RECNAT-2000; Hazelton y Murphy, 2007).

La textura de suelo fue franco con variantes, presentando dos localidades texturas de franco arenoso (Cuadro 2.3). Por otra parte, se presentó variación en contenido de humedad del suelo (Cuadro 2.3), probablemente el contenido de humedad de suelo es bajo debido a la escasa precipitación presentada en las regiones estudiadas y la época de muestreo (Octubre).

Se encontraron diferencias significativas ($P<0.01$) en *ufc* de actinomicetos en las localidades estudiadas, las localidades dos y cinco mostraron mayores promedios superando en 214, 177 y 375% a las localidades uno, tres y cuatro, respectivamente (Cuadro 2.3).

Cuadro 2.3. Características físicas del suelo, contenido de humedad y conteo en placa, de microorganismos aislados de la rizosfera de *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.

| L | Textura | Arena | Limo | Arcilla | CH | AS | BS | HS |
|---|------------------|-------|------|---------|-----|---|---|---|
| | | | | | | X10 ⁴ | X10 ⁵ | X10 ³ |
| | | % | % | % | % | <i>ufc</i> g ⁻¹ ss ⁻¹ | <i>ufc</i> g ⁻¹ ss ⁻¹ | <i>ufc</i> g ⁻¹ ss ⁻¹ |
| 1 | Franco arenoso | 77 | 20 | 3 | 2.3 | 4.2 ^b | 0.5 ^b | 0.1 ^b |
| 2 | Franco | 37 | 40 | 23 | 6.4 | 9.0 ^{a**} | 1.8 ^a | 0.3 ^b |
| 3 | Franco limoso | 18 | 59 | 23 | 4.7 | 5.1 ^b | 1.9 ^{a*} | 0.2 ^b |
| 4 | Franco arcilloso | 45 | 20 | 35 | 6.2 | 2.4 ^c | 1.5 ^a | 0.4 ^b |
| 5 | Franco arenoso | 57 | 16 | 27 | 5.5 | 8.4 ^a | 1.2 ^a | 0.7 ^{a*} |

Localidad (L). 1) Salinas, SLP, 2) Ejido, Jacalón, Salinas, SLP, 3) Calera, Zacatecas, 4) Santa María del Oro, Durango, 5) Crucero La Zarca, Durango. CH= contenido de humedad, AS= actinomicetos, BS= bacterias, HS= hongos. *ufc*= unidades formadoras de colonias. SS= suelo seco. * y ** Literales diferentes dentro de columna indican diferencias significativas Tukey ($P<0.05$) y ($P<0.01$), respectivamente.

Como se puede observar, la población de actinomicetos no muestra tendencia con características geográficas de las localidades; así mismo, en características físicas del suelo, la población de actinomicetos sigue la tendencia del pH. En el presente estudio se encontró un rango de variación en actinomicetos de 2.4×10^4 a 9.0×10^4 *ufc* g⁻¹ de suelo seco, con valores inferiores a los reportados por Zhang *et al.* (2013), quienes obtuvieron poblaciones con valores de 5×10^5 a 20.8×10^5 *ufc* g⁻¹ de suelo seco para niveles de fertilización nitrogenada de 0.1 a 0.7 g N⁻¹ g⁻¹ de suelo. Vieira y Nahas (2005), reportaron mayor variación en número de actinomicetos totales en los diferentes suelos evaluados; sin embargo, el rango fue de 35×10^5 a 125×10^5 *ufc* g⁻¹ de suelo seco. Brito-Álvarez *et al.* (1995), evaluaron diferentes tipos de

composta encontrando valores de actinomicetos de 1.4×10^5 a 3.8×10^5 *ufc g*⁻¹. Gong *et al.* (2009), compararon el efecto a largo plazo con abono y fertilización en la fracción de MO y microbios, bajo un sistema trigo-maíz en China, reportando los mayores valores 1293×10^3 *ufc g*⁻¹ de suelo seco para actinomicetos en el tratamiento donde solo se aplicó abono durante 18 años. Para población bacterias, se observaron diferencias ($P < 0.05$) en *ufc* en las diferentes localidades, siendo la uno la que menor *ufc* obtuvo por g de suelo seco, con promedio de 0.5×10^5 *ufc*, comparado con las otras localidades, las cuales fueron superiores en 360, 380, 300 y 240% para las localidades dos a cinco, respectivamente (Cuadro 2.3). El tipo de textura del suelo influyó en la población de bacterias y la textura franco arenosa presentó menores poblaciones; contrariamente, la textura franco y franco limosa presentaron mayores poblaciones. La población de bacterias muestra influencia de la MO. Poblaciones inferiores a las reportadas por Vieira y Nahas (2005), quienes encontraron mayores valores de bacterias totales en suelo, donde se cultivó sorgo, con rango de 60×10^6 a 250×10^6 *ufc g*⁻¹ de suelo seco, comparado con suelo forestal con eucaliptos establecidos. Las mayores poblaciones fueron para bacterias, seguidas de actinomicetos y, por último, hongos (Fig. 2.1).

Hernández-Flores *et al.* (2012), evaluaron la población de bacterias nativas de tres localidades del estado de Chihuahua y encontraron poblaciones totales de bacterias en rango de 4.0×10^3 a 4.0×10^5 *ufc g*⁻¹ suelo seco. Zhang *et al.* (2013), estudiaron el efecto de la interacción raíz y fertilización nitrogenada en soya, así como cualidades microbianas en rizosfera y encontraron poblaciones de bacterias en rango de 17.5×10^6 a 38.8×10^6 *ufc g*⁻¹ suelo seco y fertilización de 0.1 a 0.7 g N⁻¹ g⁻¹ de suelo. Vestergard *et al.* (2004), reportaron incremento en número de bacterias con fertilización Nitrogenada, desde niveles bajos, comparado con cero fertilización; además, se estimula, cuando se adiciona P, encontrando variación entre 5×10^6 y 60×10^6 *ufc g*⁻¹ de suelo rizosférico. Canbolat *et al.* (2006), evaluaron el efecto de la fertilización con relación al aumento al número de colonias de bacterias y encontraron que el mayor promedio ocurrió con mezcla de NP con 4.3×10^6 *ufc g*⁻¹ de suelo seco, comparado con el testigo (2×10^6 *ufc g*⁻¹ de suelo seco). Whitman *et al.* (1998), mencionan que la variación en microorganismos está influenciada por tipo y condiciones de suelo y las bacterias son las más numerosas, con rango de 4×10^6 a 2×10^9 *ufc g*⁻¹ de suelo seco.

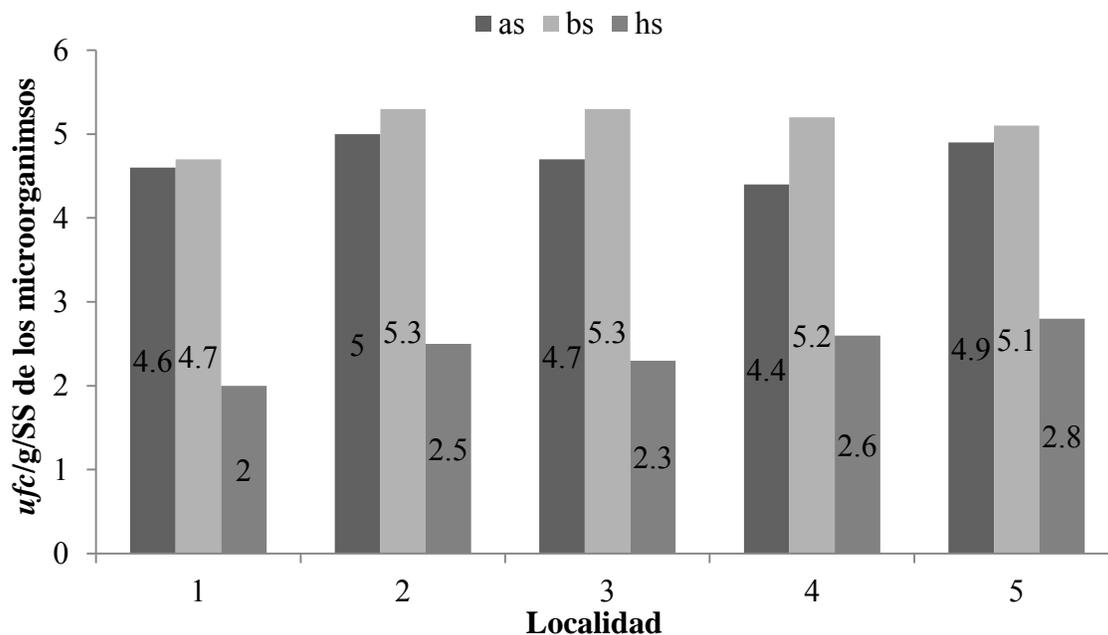


Figura 2.1. Población de microorganismos de diferentes localidades evaluadas: 1) Salinas, SLP, 2) Ejido, Jacalón, Salinas, SLP, 3) Calera, Zacatecas, 4) Santa María del Oro, Durango, 5) Crucero La Zarca, Durango. *as*= actinomicetos, *bs*= bacterias, *hs*= hongos. *ufc*= unidades formadoras de colonias, por gramo, todas en base suelo seco. Datos transformados a Log, base 10.

Por otro lado Verma *et al.* (2011), evaluaron la dinámica poblacional e identificaron cepas eficientes de *Azospirillum* en siembras de maíz en India, en cuatro diferentes tipos de suelo y encontraron en Entisol/Inceptisol 46×10^5 *ufc g*⁻¹ de suelo; en Calcáreo, 20×10^5 *ufc g*⁻¹ de suelo; vertisol, 16.5×10^5 *ufc g*⁻¹ de suelo y 6.5×10^5 *ufc g*⁻¹ de suelo, para no calcáreos; similarmente, reportaron diferencias en población de cepas nativas de *Azospirillum* para tres genotipos de maíz y, la mayor población (68×10^5 *ufc g*⁻¹ de suelo seco), la observaron en el genotipo tradicional, seguido de un genotipo compuesto con 33×10^5 *ufc g*⁻¹ de suelo seco y, la menor población, en maíz híbrido con 11×10^5 *ufc g*⁻¹ de suelo seco; los autores atribuyen esta menor población, a que el desarrollo de híbridos se maneja con altas dosis de fertilización química, por tanto, es ventajoso la utilización de genotipos adaptados a condiciones de suelo y clima. Por otra parte Kuske *et al.* (2002), evaluaron bacterias del suelo rizosférico en tres especies de gramíneas de zonas áridas y encontraron las mayores poblaciones en los primeros 10 cm de profundidad con 73×10^5 , 105×10^5 y 96×10^5 *ufc g*⁻¹ de suelo seco para *Stipa*, *Hilaria*

y *Bromus*, respectivamente. Ridder-Duine *et al.* (2005), estudiaron la composición de la comunidad de bacterias mediante conteo en placa, observando poblaciones cuyos valores oscilaron de 3.4×10^9 a 2.35×10^8 *ufc g*⁻¹ de suelo y poblaciones de 2.24×10^7 a 1.22×10^6 *ufc g*⁻¹ de suelo, para conteo en placa de rizosfera y suelo, respectivamente. Por otro lado Brito-Álvarez *et al.* (1995), evaluaron el efecto de la composta en la microflora de la rizosfera en tomate y la incidencia de rizobacterias en el crecimiento vegetal, encontrando poblaciones cuyos valores oscilaron entre 8.0×10^6 a 12.5×10^6 *ufc g*⁻¹, la mayor población se presentó en el tratamiento con mayor acidez. Gong *et al.* (2009), utilizando abono, reportaron mayor población de bacterias (121×10^5 *ufc g*⁻¹ de suelo), respecto al uso de fertilizante inorgánico.

Espinosa-Victoria *et al.* (2006), encontraron mayores poblaciones de *A. brasilense* en invierno en un sistema de labranza de conservación, comparado con un sistema de labranza convencional y mencionan que altas poblaciones de *Azospirillum* probablemente se deben a mayor cantidad de Carbono, Nitrógeno y humedad que resultan de la desintegración de la MO después de la cosecha. Además de factores que influyen positivamente la supervivencia de *A. brasilense*: porcentaje de arcilla, contenido de MO, capacidad del suelo para retener agua y contenido de Nitrógeno.

Cárdenas *et al.* (2010), observaron mayor presencia de *Azospirillum* en lluvias, respecto a la época de secas señalando que son capaces de sobrevivir en época de secas, debido a que pueden cambiar sus características fisiológicas, tal como actividad metabólica. Similarmente Brasil *et al.* (2005), Garrido *et al.* (2010) y Reis *et al.* (2004), reportaron valores menores en población de bacterias en la época de seca. Sampaio *et al.* (2012), evaluaron bacterias diazotróficas promotoras del crecimiento vegetal, aisladas de *Pennisetum purpureum*, en cinco diferentes medios de cultivo, observando poblaciones que variaron de 10^2 a 10^6 *ufc g*⁻¹ de peso fresco, además, diferencias significativas en población de bacterias en ambos genotipos y medios de cultivo. Estos autores aislaron 204 bacterias diazotróficas de diferentes tejidos de la planta, de las cuales el 19.6% fueron aisladas de hoja, 19.6% de raíz y 60.8% de tallo.

Las poblaciones de hongos mostraron diferencias ($P < 0.05$) para localidades, con valor superior de 0.7×10^3 e inferior de 0.1×10^3 *ufc g*⁻¹ de suelo seco (Cuadro 2.3). La población de hongos no mostró tendencia respecto a localidad ni para características químicas y físicas del suelo. La mayor población de hongos se encontró en la localidad con mayor contenido de MO y viceversa. Lo anterior, indica que la MO influye la dinámica de poblaciones de hongos.

Zhang *et al.* (2013), reportaron poblaciones de 3.5×10^4 a 12.5×10^4 *ufc g*⁻¹ de suelo seco para niveles de fertilización nitrogenada con rango de 0.1 a 0.7 g N⁻¹ g⁻¹ de suelo. Canbolat *et al.* (2006), reportaron mayores promedios de *ufc* de hongos, cuando se adicionó mezcla de NP comparado con el testigo, cuyos valores fueron 2.8×10^6 y 1.4×10^6 *ufc g*⁻¹ de suelo seco, respectivamente. Brito-Álvarez *et al.* (1995), evaluaron diferentes tipos de composta sobre la población de hongos, observando de 3.6×10^4 a 6.4×10^4 *ufc g*⁻¹, las mayores poblaciones se presentaron en el testigo, el cual presentó pH mayor y menores valores en MO, N, P, K, Mg y Ca. Gong *et al.* (2009), evaluaron el efecto de aplicar abono y fertilizante inorgánico durante 18 años, en poblaciones de hongos y encontraron que el tratamiento donde solo se aplicó abono mostró mayor promedio (24×10^3 *ufc g*⁻¹ de suelo). Por su parte Álvarez-Solís y Anzueto (2004), no encontraron diferencias significativas en *ufc* de actinomicetos, bacterias y hongos en las localidades estudiadas y entre sistemas de producción.

Cuadro 2.4. Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre microorganismos y características del suelo donde se realizaron los muestreos.

| Parámetros | Coeficiente (r) | | | |
|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| | L | MO | CE | N |
| AS | 0.101 ^{NS} | 0.571 ^{NS} | 0.888* | -0.079 ^{NS} |
| BS | 0.310 ^{NS} | 0.072 ^{NS} | 0.515 ^{NS} | -0.954* |
| HS | 0.893* | 0.912* | 0.617 ^{NS} | -0.204 ^{NS} |
| N-NH ₄ | 0.968** | 0.744 ^{NS} | 0.349 ^{NS} | -0.307 ^{NS} |

NS no significativo. * y ** ($P < 0.05$) y ($P < 0.01$), respectivamente. AS= actinomicetos, BS= bacterias, HS= hongos. L= localidad, MO= MO, CE= conductividad eléctrica, N= nitrógeno, N-NH₄= amonio.

La correlación entre poblaciones de microorganismos y características químicas del suelo no mostró significancia ($P > 0.05$) entre microorganismos (Cuadro 2.4), observándose valores de $r = 0.24$, $P > 0.70$, para AS con BS y para AS con HS $r = 0.42$, $P > 0.48$. Sin embargo, se presentaron correlaciones altas entre AS con CE; BS con N; HS con Localidad (L) y MO (MO); N-NH₄ con L. Por otro lado, se presentaron altas correlaciones que no fueron significativas, L con MO, $r = 0.80$, $P > 0.11$; AS con pH, $r = 0.78$, $P > 0.12$; AS con N-NO₃, $r = 0.74$, $P > 0.15$; BS con Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC), $r = 0.86$, $P > 0.06$; BS con Fósforo, $r = 0.76$, $P > 0.14$; BS con N-NO₃, $r = 0.75$, $P > 0.14$ y HS con N-NH₄, $r = 0.78$, $P > 0.12$.

2.5. Conclusiones

Existe gran diversidad de microorganismos nativos con potencial para generar inoculantes microbianos, incrementar la producción de forraje con potencial para atender las necesidades de nutrientes, principalmente Nitrógeno y Fosforo en condiciones de temporal de zonas áridas. Las poblaciones reportadas son nativas de regiones semiáridas y juegan un papel importante para el aprovechamiento sustentable de los recursos forrajeros nativos.

El tipo de suelo, MO, CE y N presentes influyen en la dinámica de comunidades de microorganismos presentes en la rizosfera.

2.6. Literatura Citada

- Adesemoye, A. O., H. A. Torbert y J. W. Kloepper. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb Ecol* 58: 921-929
- Alarcón, A y R. Ferrera-Cerrato. 2000. Biofertilizantes: importancia y utilización en la agricultura. *Agricultura Técnica en México* 26(2): 191-203.
- Álvarez-Solís, J. D y M. Anzueto-Martínez. 2004. Actividad microbiana del suelo bajo diferentes sistemas de producción de maíz en los altos de Chiapas, México. *Agrociencia* 38: 13-22.
- Ambrosini, A., A. Beneduzi, T. Stefanski, F. G. Pinheiro, L. K. Vargas, L. M. P. Passaglia. 2012. Screening of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L). *Plant Soil* 356: 245-264.
- Beare, M. H., M. Vikram, G. Tian y S. C. Srivastava. 1997. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function in the tropics: the role of decomposer biota. *Applied Soil Ecology* 6: 87-108.
- Bewley, J. D., and M. Black. 1994. *Seeds, Physiology of Development and Germination*. 2^{da}. Ed. Plenum Press. New York. 445pp.
- Birkhofer, K., T. Diekötter, S. Boch, M. Fischer, J. Müller, S. Socher y V. Wolters. 2011. Soil fauna feeding activity in temperate grassland soils increases with legume and grass species richness. *Soil Biology & Biochemistry* 43: 2200-2207.

- Brasil, M. S., J. I. Baldani, V. L. D. Baldani. 2005. Occurrence and diversity of diazotrophic bacteria associated to forage grasses of the Pantanal in the state of Mato Grosso do Sul. *Rev. Bras. Cienc. Solo* 29(2): 179-190.
- Brito-Álvarez, M. A., S. Gagne y H. Antoun. 1995. Effect of compost on rhizosphere microflora of the tomato and on the incidence of plant growth-promoting rhizobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 6(1): 194-199.
- Buyer, J. S y D. D. Kaufman. 1996. Microbial diversity in the rhizosphere of corn grown under conventional and low-input systems. *Applied Soil Ecology* 5: 21-27.
- Canbolat, M. Y., S. Bilen, R. Cakmaker, F. Sahin y A. Aydm. 2006. Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. *Biol Fertil Soils* 42: 350-357.
- Cárdenas, D. M., M. F. Garrido, R. R. Bonilla y V. L. Baldani. 2010. Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* spp. en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar. *Pastos y Forrajes* 33(3): 1-17.
- Carmona, C. P., A. Roder, F. M. Azcárate y B. Peco. 2013. Grazing management or physiography? Factors controlling vegetation recovery in Mediterranean grasslands. *Ecological Modelling* 251: 73-84.
- Carpenter-Boggs, P. D. Stahl, M. J. Lindstrom y T. E. Schumacher. 2003. Soil microbial properties under permanent grass, conventional tillage, and no-till management in South Dakota. *Soil & Tillage Research* 71: 15-23.
- Cavaglieri, L., J. Orlando y M. Etcheverry. 2009. Rhizosphere microbial community structure at different maize plant growth stages and root locations. *Microbiological Research* 164:391-399.
- Celaya-Michel, H y A. E. Castellanos-Villegas. 2011. Mineralización de nitrógeno en el suelo de zonas áridas y semiáridas. *Terra Latinoamericana* 29(3): 343-356.
- Chen, M., B. Chen y P. Marschner. 2008. Plant growth and soil microbial community structure of legumes and grasses grown in monoculture or mixture. *J of Environmental Sciences* 20(10): 1231-1237.
- Escalante-Lozada, A., G. Gosset-Lagarda, A. Martínez-Jiménez y F. Bolívar-Zapata. 2004. Diversidad bacteriana del suelo: métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. *Ensayo. Agrociencia* 38: 583-592.

- Espinosa, R. M., E. Andrade, P. Rivera y A. Romero. 2011. Degradación de suelos por actividades antrópicas en el norte de Tamaulipas, México. *Papeles de Geografía* 53-54: 77-88.
- Espinosa-Victoria, D., L. Hernández-Flores, L. López-Reyes. 2006. Diversidad genética de *Azospirillum brasilense* en suelos cultivados con maíz con labranza convencional y de conservación. *Terra Latinoamericana* 24(2):215-223.
- Garbeva, P., J. D. Van-Elsas y J. A. Van-Veen. 2008. Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. *Plant Soil* 302: 19-32.
- García, E. 2005. Modificación al sistema de clasificación climática de Köppen. 4ª. Ed. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Garrido, M. F., D. M. Cárdenas, R. R. Bonilla y V. L. Baldani. 2010. Efecto de los factores edafoclimáticos y la especie de pasto en la diversidad de bacterias diazotróficas. *Pastos y Forrajes* 33(4): 1-11.
- Gesheva, V. 2002. Rhizosphere microflora of some citrus as a source of antagonistic actinomycetes. *European Journal Soil Biology* 38: 85-88.
- Gong, W., X. Yan, J. Wang, T. Hu y Y. Gong. 2009. Long-term manure and fertilizer effects on soil organic matter fractions and microbes under a wheat-maize cropping system in northern China. *Geoderma* 149: 318-324.
- Grageda-Cabrera, O. A., A. Díaz-Franco, J. J. Peña-Cabriales y J. A. Vera-Nuñez. 2012. Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3(6): 1261-1274.
- Hazelton, P. and B. Murphy. 2007. Interpreting soil test results. What do all the numbers mean. 2^{da}. Ed. CSIRO Publishing. Australia. 156pp.
- Hernández, Y., O. García y M. Ramón. 2001. Utilización de algunos microorganismos del suelo en cultivos de interés para la ganadería. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 35(2): 85-97.
- Hernández-Flores, L., J. A. Munive-Hernández, E. Sandoval-Castro, D. Martínez-Carrera y M. C. Villegas-Hernández. 2012. Poblaciones bacterianas: alternativa sustentable para la agricultura. *Terra Latinoamericana* 30: 129-138.

- Hollister, E. B., C. W. Schadt, A. V. Palumbo, R. J. Ansley y T. W. Boutton. 2010. Structural and functional diversity of soil bacterial and fungal communities following woody plant encroachment in the southern great plains. *Soil Biology & Biochemistry* 42: 1816-1824.
- INEGI. 2005. Marco Geoestadístico Nacional. Productos y Servicios. Localidades. México, D. F.
- Kuske, C. R., L. O. Ticknor, M. E. Miller, J. M. Dunbar, J. A. Davis, S. M. Barns y J. Belnap. 2002. Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and the interspaces in an arid grassland. *Applied and Environmental Microbiology* 68(4): 1854-1863.
- Martínez-Viera, R., B. Dibut y Y. Ríos. 2010. Efecto de la integración de aplicaciones agrícolas de biofertilizantes y fertilizantes minerales sobre las relaciones suelo-planta. *Reseña. Cultivos Tropicales* 31(3): 27-31.
- Nehl, D. B., S. J. Allen y J. F. Brown. 1996. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. *Review. Applied Soil Ecology* 5: 1-20.
- Padilla, C y D. M. Cino. 2003. Estudio preliminar del efecto de métodos de rehabilitación en la recuperación de un pastizal de guinea común (*Panicum maximun*) establecida previamente mediante siembras ralas. *Revista Cubana de Ciencias Agrícolas* 37(2): 201-206.
- Padilla, C., G. Crespo y Y. Sardiñas. 2009. Degradación y recuperación de pastizales. *Revista Cubana de Ciencias Agrícolas* 43(4): 351-354.
- Prieto, L. H., M. B. Bertiller, A. L. Carrera y N. L. Olivera. 2011. Soil enzyme and microbial activities in a grazing ecosystem or Patagonian Monte, Argentina. *Geoderma* 162: 281-287.
- Reis Junior, F. B., M. F. Silva, K. R. S. Teixeira, S. Urquiaga y V. M. Reis. 2004. Identification of *Azospirillum amazonense* isolates associated to *Brachiaria* spp. at different stages and growth conditions, and bacterial plant hormone production. *Rev. Bras. Cienc. Solo* 28(1): 103-113.
- Richardson, A., J. M. Barea., A. M. McNeill y C. Pringent-Combaret. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321: 305-339.
- Ridder-Duine, A. S., G. A. Kowalchuk, P. J. A. Klein-Gunnewiek, W. Smant, J. A. Van-Veen y W. de Boer. 2005. Rhizosphere bacterial community composition in natural stands of

- Carex arenaria* (sand sedge) is determined by bulk soil community composition. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 349-357.
- Rodríguez, F. H y J. Rodríguez. A. 2011. Métodos de análisis de suelos y plantas. Criterios de interpretación. 2^{da}. Ed. Trillas. México. D. F. 239pp.
- Sampaio, V. S., D. Messias, R. Fiusa, W. Lustrino, V. L. Divan y J. I. Baldani. 2012. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. *Plant Soil* 356: 51-66.
- Sanauallah, M., E. Blagodatskaya, A. Chabbi, C. Rumpel y Y. Kuzyakov. 2011. Drought effects on microbial biomass and enzyme activities in the rhizosphere of grasses depend on plant community composition. *Applied Soil ecology* 48: 38-44.
- Sant'Anna, F. H., L. G. P. Almeida, R. Cecagno, L. A. Reolon, F. M. Siqueira, M. R. S. Machado, A. T. R. Vasconcelos y I. S. Schrank. 2011. Genomic insights into the versatility of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum amazonense*. *BMC Genomics* 12: 409-422.
- Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Secretaria del medio ambiente (SEMARNAT 2002). Diario oficial (Segunda edición).
- Singh, B. K., S. Munro, J. M. Potts y P. Millard. 2007. Influence of grass species and soil type on rhizosphere microbial community structure in grassland soils. *Applied Soil Ecology* 36: 147-155.
- Singh, J. S., V. C. Pandey y D. P. Singh. 2011. Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Review. Agriculture, Ecosystems and Environment* 140: 339-353.
- Soroa-Bell, M. R., A. Hernández-Fernández, F. Soto-Carreño y E. Terry-Alfonso. 2009. Identificación de algunas especies de microorganismos benéficos en la rizosfera de Gerbera y su efecto en la producción. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15(2): 41-48.
- Statistical Analysis System (SAS). 2003. User's Guide: statistics. Version 9.1. SAS Institute Inc. Cary, NC. USA.
- Stromberger, M. E., Z. Shah y D. G. Westfall. 2011. High specific activity in low microbial biomass soils across a no-till evapotranspiration gradient in Colorado. *Soil Biology & Biochemistry* 43: 97-105.

- Tian, Y., X. Zhang, J. Liu, Q. Chen y L. Gao. 2009. Microbial properties of rhizosphere soils as affected by rotation, grafting and soil sterilization in intensive vegetable production systems. *Scientia Horticulturae* 123: 139-147.
- Verma, R., S. K. Chourasia y M. N. Jha. 2011. Population dynamics and identification of efficient strains of *Azospirillum* in maize ecosystems of Bihar (India). *3 Biotech* 1: 247-253.
- Vestergard, M., L. Bjornlund and S. Christensen. 2004. Aphid effects on rhizosphere microorganisms and microfauna depend more on barley growth phase than on soil fertilization. *Oecologia* 141: 84-93.
- Vieira, F. C. S y E. Nahas. 2005. Comparison of microbial numbers in soils by using various culture media and temperatures. *Microbiological Research* 160: 197-202.
- Wakelin, S. A., A. L. Gregg., R. J. Simpson., G. D. Li., I. T. Riley and A. C. McKay. 2009. Pasture management clearly affects soil microbial community structure and N-cycling bacteria. *Pedobiologia* 52: 237-251.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J., 1998. Procarote the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 6578–6583.
- Widmer, F., F. Rasche, M. Hartmann y A. Fliessbach. 2006. Community structures and substrate utilization of bacteria in soils from organic and conventional farming systems of the DOK long-term field experiment. *Applied Soil Ecology* 32: 294-307.
- Yong, Z. S., Z. Ha-Lin, Z. Tong-Hui y Z. Xue-Yong. 2004. Soil properties following cultivation and non-grazing of a semi-arid sandy grassland in northern China. *Soil & Tillage Research* 75: 27-36.
- Yong, Z. S., L. Yu-Lin, C. Jian-Yuan y Z. Wen-Zhi. 2005. Influences of continuous grazing and livestock exclusion on soil properties in a degraded sandy grassland, Inner Mongolia, northern China. *Catena* 59: 267-278.
- Zhang, X., G. Huang, X. Bian y Q. Zhao. 2013. Effects of root interaction and nitrogen fertilization on the chlorophyll content, root activity, photosynthetic characteristics of intercropped soybean and microbial quantity in the rhizosphere. *Plant Soil Environ* 59(2): 80-88.

CAPÍTULO III. DIVERSIDAD GENÉTICA DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO DE VIDA LIBRE, EN SUELOS DE REGIONES ÁRIDAS, ASOCIADOS CON PASTOS NATIVOS DE MÉXICO

Resumen

La mayoría de las investigaciones realizadas sobre el beneficio de bacterias diazotróficas, se ha desarrollado en cultivos básicos, por lo que no existe información de la interacción y efecto que pudieran tener en el rendimiento de pastos. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de cepas de vida libre, para fijar Nitrógeno atmosférico y producción de sustancias reguladoras del crecimiento en asociación con pastos nativos de zonas áridas de México. El experimento se realizó en el área de Bacteriología del Programa de Fitopatología, del *Campus* “Montecillo” del Colegio de Posgraduados, Km 36.5 carretera México-Texcoco, Texcoco, Estado de México (19° 27' Norte y 98° 54' Oeste), a 2220 msnm, clima Cw, el menos seco de los áridos con lluvias en verano, temperatura media anual de 14.6 °C y precipitación media anual de 500 mm. Se tomaron muestras de suelo de la rizosfera en donde se desarrolla de forma natural *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., de cinco localidades, [1) Salinas, San Luis Potosí; 2) Ejido, Jacalón, Salinas, San Luis Potosí; 3) Calera, Zacatecas; 4) Santa María del Oro, Durango; y 5) Crucero La Zarca, Durango], las cuales se tamizaron en malla de 2 mm hasta obtener aproximadamente 1 kg de suelo tamizado. De éste, se pesaron 100 g para determinar características físicas y químicas de las cinco localidades. Para estimar la población de bacterias por localidad, se pesaron 10 g de suelo. Con éstos, se realizaron diluciones seriadas con base 10 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} y 10^{-10}); de las cuales, se tomó de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} una alícuota de 0.1 ml y se vertió sobre placas con medio de cultivo gelificado para bacterias totales (agar nutritivo) y se distribuyó uniformemente, se prepararon cinco repeticiones por dilución. Las siembras en placa se incubaron a 30 °C. Las unidades formadoras de colonias (ufc) se cuantificaron a las 24, 40 y 72 h, mediante dilución en placa. De las bacterias que crecieron, se realizaron nuevamente cultivos, cada una en placa con medio de agar nutritivo y medio de cultivo libre de nitrógeno (NFb), mediante estría cruzada (para mantener la cepa pura) y, previamente identificada e incubadas a 30 °C por 72 h; una vez desarrolladas las colonias, dependiendo su velocidad de crecimiento, se describieron considerando forma, elevación, borde, textura y color. Con esta caracterización se seleccionaron cinco cepas. Se aislaron 489 cepas, las cuales se sembraron

en placas Petri; de este total, 120, 69, 112, 137 y 51 pertenecen a las localidades uno, dos, tres, cuatro y cinco, respectivamente. De 489 cepas aisladas, 440 crecieron en medio NFb, específico para *Azospirillum*; posteriormente, se seleccionaron 129 por rápido crecimiento. De éstas, 28, 22, 30, 27 y 22 correspondieron a las localidades uno, dos, tres, cuatro y cinco, respectivamente y se les realizó confirmación con medio de cultivo con Rojo Congo, donde se desarrollaron 25 cepas, mismas que se caracterizaron de acuerdo a forma, elevación, borde, textura y color en agar nutritivo. Seis, cuatro, 10, dos y tres cepas pertenecían a las localidades uno, dos, tres, cuatro y cinco, respectivamente y, de estas últimas, se seleccionaron cinco cepas: a66 localidad dos; I27 e I95 localidad tres; S73 localidad cuatro y ZA40 de la localidad cinco para estudios posteriores.

3.1. Revisión de Literatura

3.1.1. Fertilidad de suelo

Luna *et al.* (2013), indican que se basa en la capacidad que tiene los suelos para poner en disposición los nutrientes necesarios para el desarrollo y crecimiento de plantas, desarrollando un papel importante la comunidad microbiana que participa activamente en la captura de nutrientes y mineralización de MO. Terry *et al.* (2005), mencionan que en la agricultura ecológica el uso de biofertilizantes en los sistemas de producción es una alternativa viable e importante; además, permite reducir costos, elimina contaminación, promueve la conservación, fertilidad y biodiversidad del suelo. Geissen y Morales (2006), señalan que la MO y la acidez del suelo son parámetros químicos de mayor influencia sobre los microorganismos del suelo y los procesos de descomposición, también, indican que la descomposición de hojarasca y presencia de lombrices son indicadores para determinar que un suelo es fértil en condiciones tropicales; sin embargo, la biomasa microbiana como parámetro no es un indicador para describir tal efecto. Elizondo (2006), argumentan que el Nitrógeno es un nutriente indispensable para la producción; sin embargo, es un contaminante potencial del aire y agua; similarmente, el estiércol es fuente excelente de nutrientes para plantas y a los suelos donde se incorpora requieren menor cantidad de fertilizantes químicos, incrementando la cantidad de MO y contribuyendo a menor escorrentía y erosión, además, presentan ventajas en cuanto a condiciones físicas y biológicas.

3.1.2. Fertilización química

La fertilización es fundamental en la agricultura moderna porque suministra nutrientes esenciales; sin embargo, el exceso de fertilización causa un impacto negativo al contaminar el ambiente y mantos acuíferos (Adesemoye *et al.*, 2009). Garrido *et al.* (2010); Grageda *et al.*, (2012), mencionan que los altos costos de la fertilización inorgánica es una limitante para su uso y ocasiona pérdida de diversidad biológica, deterioro de recursos naturales, erosión de suelo, cambio climático, etc., lo que ha provocado la disminución de superficie apropiada para la agricultura y consecuentemente problemas ecológicos, económicos y sociales; por esta razón, es urgente aplicar soluciones para mantener la sustentabilidad. Kennedy *et al.* (2004), señalan que el uso de fertilizantes químicos disminuye la disponibilidad de combustibles fósiles, genera gases de efecto invernadero y los biofertilizantes pueden reducir este efecto. La inoculación con biofertilizantes puede ayudar a mitigar el calentamiento global, manteniendo el equilibrio ecológico, así mismo, reduciendo costos para productores. Rebolledo (1998), indica que para incrementar rendimientos e ingresos netos por cultivo por unidad de superficie, se deben manejar factores y, el de mayor importancia, es la fertilización. Cárdenas *et al.* (2004), argumentan que el uso de fertilizantes nitrogenados presenta riesgos de contaminación del ambiente por lixiviación hacia aguas subterráneas del Nitrógeno no absorbido y su uso indiscriminado conlleva a degradación del suelo por salinidad, además de incrementar costos de producción. Por otra parte, su uso adecuado proporciona grandes beneficios. La aplicación indiscriminada de fertilizantes químicos ocasiona problemas globales y daña la salud humana (Pool-Novelo *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2008).

3.1.3. Importancia del Nitrógeno

El Nitrógeno es el elemento que limita la productividad en regiones áridas y semiáridas, después, del agua, éste naturalmente está presente en la atmósfera en forma de gas; sin embargo, no está disponible para la planta y, para su disponibilidad, se necesita establecer asociaciones con bacterias del suelo. Además, la escasa MO (MO) en el suelo no puede aprovecharse por la planta, para ello, se debe realizar un proceso de descomposición y mineralización por microorganismos del suelo (Celaya-Michel y Castellanos-Villegas, 2011).

3.1.4. Ciclo del Nitrógeno

Elizondo (2006), menciona que el ciclo del Nitrógeno es complejo y dinámico puesto que comprende transformaciones microbianas, las cuales son afectadas por diversos factores: temperatura, humedad, aireación y pH del suelo, entre otros (Figura 3.1).

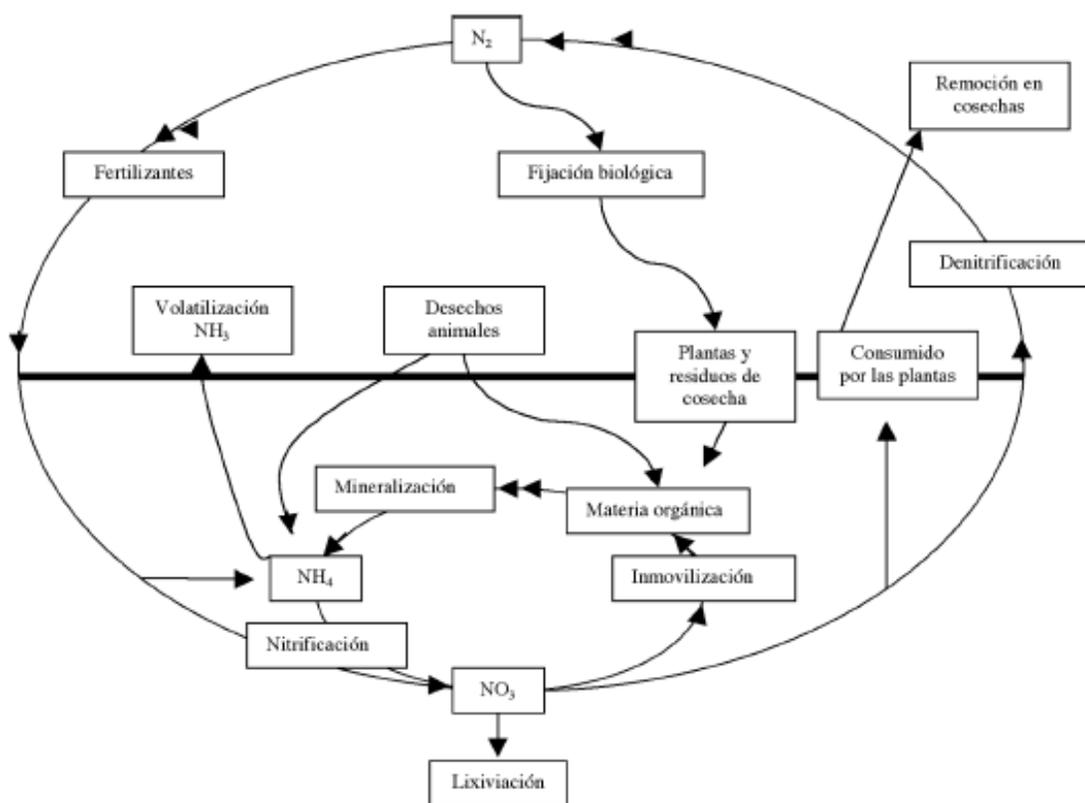


Figura 3.1. Ciclo de Nitrógeno (Beegle, 2004).

3.1.5. Mineralización del Nitrógeno

La mayoría del Nitrógeno del suelo se pierde por exceso en aplicación y manejo inadecuado. El exceso de Nitrógeno produce gases que reducen la capa de ozono; además, producen nitritos que contaminan el agua. La educación y políticas deben de utilizarse para corregir ésto, la investigación, para detectar la nitrificación y mejorar la absorción orgánica del Nitrógeno, lo que podría proporcionar beneficios a la sociedad (Nannipieri y Eldor 2009). Valle *et al.* (2008), mencionan que en regiones tropicales un tema importante es la mineralización del Nitrógeno del suelo debido a que proviene de la MO, la cual aporta una cantidad significativa de captura total de Nitrógeno por el pasto. Señalan que la mineralización de Nitrógeno es diferente en leguminosas en relación a pastos e indican que probablemente se

debe a bajas concentraciones de Nitrógeno en suelo con respecto a la cantidad de MO presente, pH en el suelo o la población de microorganismos que afectan la mineralización del Nitrógeno. Flores *et al.* (2010), evaluaron la mineralización de Nitrógeno en biosólidos estabilizados con cal y observaron que la tasa de mineralización cambia con relación a la textura del suelo; además, encontraron que en suelos francos hay mayor tasa de mineralización (20 mg kg⁻¹ de suelo) con aplicación de 600 kg ha⁻¹ de biosólidos comparado con suelo arcilloso. Celaya-Michel y Castellanos-Villegas (2011), mencionan que en regiones áridas y semiáridas es baja la incorporación de MO al suelo debido a la limitada cubierta vegetal. La mineralización en ecosistemas áridos y semiáridos ocurre de forma heterogénea, debido a microclima y disponibilidad de MO por la presencia de mayor cantidad de plantas presentes en manchones fértiles y esto trae como resultado mayor cantidad de Nitrógeno y nutrientes para las plantas en dichos sitios. También, indican que el proceso de mineralización ocurre con mayor frecuencia en lugares con presencia de árboles y arbustos leguminosos, los cuales aumentan la mineralización de Nitrógeno y una mayor eficiencia en el uso de agua.

3.1.6. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal de vida libre

Los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum* (Acebo *et al.*, 2007; Guzmán *et al.*, 2012), *Enterobacter* (Sánchez *et al.*, 2012), *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Beijerinckia* y *Derxia* (Garrido *et al.*, 2010; Obando *et al.*, 2010), son empleados como promotores del crecimiento vegetal por su capacidad para fijar Nitrógeno atmosférico y generar metabólicos secundarios. Cada día es mayor la utilización de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en cultivos de interés económico para incrementar la producción de alimentos, manteniendo una agricultura sustentable con el menor daño al ambiente (Pazos y Hernández, 2001; Torriente, 2010). Lucy *et al.* (2004), señalan que la utilización de bacterias promotoras del crecimiento vegetal es una alternativa para incrementar la productividad y mencionan que es necesario conocer las bacterias que mejor respondan a cada sistema de producción, para que ocurra mayor sinergia planta-bacteria, así como comprender los factores involucrados en la conservación del ambiente. Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal tienen gran potencial en la agricultura como biofertilizantes (Vessey, 2003; Luna *et al.*, 2013), además, indican que estas bacterias promueven el crecimiento y morfología de raíces mediante sustancias reguladoras, tales como fitohormonas y enzimas, que resultan en

mayor superficie de área de raíz y, en consecuencia, en incremento en la absorción de nutrientes y producción de sideróforos, facilitando la captación de hierro y solubilización de fósforo, resultando en mayor oferta de nutrientes. Carcaño *et al.* (2006), indican que las rizobacterias presentan cualidades como promotoras del crecimiento vegetal, fijadoras de Nitrógeno y proveedoras de sustancias reguladoras del crecimiento, con lo cual benefician a las plantas, con esta asociación se mejora la disponibilidad de nutrientes en el suelo y disminuye la incidencia de enfermedades y uso de recursos no renovables. Sampaio *et al.* (2012), mencionan que la caracterización de diversidad y fisiología de bacterias diazotróficas es un prerequisite para determinar el potencial que tienen estas cepas para su uso en campo. Hernández *et al.* (2004), señalan que cepas de *Pseudomonas* y *Burkholderia* son promotoras de metabolitos del tipo de ácido indolacético, sideróforos y ácido salicílico, los cuales promueven crecimiento vegetal en cultivos de interés económico. Rives *et al.* (2007), indican que al realizar una agricultura sostenible se deben una forma adecuada la aplicación de fertilizantes químicos y microorganismos y el uso de inoculantes bacterianos constituye una alternativa ecológica para la conservación del ambiente. Los grupos utilizados son bacterias promotoras del crecimiento vegetal que interactúan mediante mecanismos de producción de fitohormonas, fijación biológica de Nitrógeno y biocontrol de patógenos. También mencionan que las bacterias promotoras del crecimiento deben ser cepas nativas adaptadas a las condiciones de la región para contrarrestar el uso indiscriminado de los fertilizantes químicos, aunado a esto, se deben establecer metodologías para aislamiento, identificación y mecanismos de acción, permitiendo mejorar el manejo de estos microorganismos.

3.1.7. Género *Azospirillum* spp.

Rodríguez (1982), menciona que *Azospirillum* spp., incluye bacterias con atributos tales como, fijación de Nitrógeno en gramíneas que se puede aislar de suelo y/o raíces mediante medios de cultivo libres de Nitrógeno. Además, observó, que colonias en Rojo Congo a 37°C por 96 h presentaron color escarlata, rápido crecimiento, consistencia seca, diámetro de 1.5 a 2 mm, forma redonda e irregular, ondulada en el borde y superficie rugosa con crestas radiales en el centro. También, encontró otras bacterias que se asocian con la raíz: *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Pseudomonas*, las cuales son circulares, convexas, translúcidas y suaves; sin embargo, no absorben el Rojo Congo. Muchas de las colonias puras de *Azospirillum* se

obtienen fácilmente con este medio. Verma *et al.* (2011), indican que es un prerequisite importante conocer la carga microbiana y la diversidad de comunidades nativas. *Azospirillum* tiene un rol importante para maíz al cual suministra nutrientes, principalmente Nitrógeno. Parra y Cuevas (2001), mencionan que *Azospirillum* puede sobrevivir y adaptarse a diversos ambientes con diversas vías para esta asociación, puesto que puede consumir gran diversidad de compuestos orgánicos, azúcares, aminoácidos, etc., por lo que este género presenta cualidades que le ayudan a competir contra otros microorganismos en la rizosfera.

3.1.8. Interacción suelo-planta-microorganismo

La supervivencia de *A. brasilense* en una rizosfera colonizada es independiente de la aridez; sin embargo, siete parámetros abióticos controlan la supervivencia de esta bacteria: porcentaje de arcilla, Nitrógeno, MO, CaCO₃, arena fina:gruesa y capacidad de retención de agua; además, por manejo (percolación del agua) la población de *A. brasilense* es afectada directamente y con rapidez (Bashan *et al.*, 1995). Cárdenas *et al.* (2010), mencionan que *Azospirillum* tiene la capacidad de desarrollar mecanismos de colonización, encontrándose principalmente en la zona de elongación de raíz, sobre las capas de mucigel; además, puede colonizar penetrando células corticales de la raíz. Baca *et al.* (2000), señalan dos acontecimientos biológicos fundamentales que aseguran la disponibilidad del carbono y Nitrógeno en los seres vivos, los cuales se originan del gas carbónico y del Nitrógeno molecular: fotosíntesis y fijación biológica de Nitrógeno. La fijación de Nitrógeno la realizan bacterias que están adaptadas a diversos estilos de vida y todas presentan la enzima nitrogenasa. Pérez y Casa (2005), estudiaron la interacción planta-*Azospirillum* en caña de azúcar (*Saccharum* spp.), argumentan que la rizosfera de este cultivo presenta cualidades para el desarrollo de *Azospirillum*, debido a la presencia de fuentes de carbón y energía y estas se originan de los exudados radicales y residuos vegetales que se depositan en el suelo.

3.1.9. Fijación biológica de Nitrógeno

Es importante la entrada de Nitrógeno al sistema mediante fijación biológica del mismo por microorganismos de vida libre y/o simbiótica, siendo relevante para ecosistemas que tienen limitada entrada de Nitrógeno, como las regiones áridas y semiáridas. La incorporación de Nitrógeno al suelo beneficia a la planta con la asociación simbiótica y, al morir éstas (Celaya-

Michel y Castellanos-Villegas, 2011). Baca *et al.* (2000), mencionan que el descubrimiento de la fijación biológica de Nitrógeno en leguminosas se remonta al siglo XIX y señalan, que la fijación biológica de Nitrógeno a amonio la realizan únicamente procariotes y microorganismos que presentan nitrogenasa convencional, proceso aeróbico. Los mejores fijadores son aquellos que involucran energía y oxígeno proporcionados por las plantas y, dentro de los diazótrofos, se incluyen los de vida libre, simbióticos y endófitos. En suelos tropicales hay bajo intercambio de iones y fertilidad, relacionada con la MO presente.

3.1.10. Reducción de acetileno

García *et al.* (2006; 2007), encontraron incrementos en la producción de biomasa debido a la producción de ácido indol-acético mediante aportación de mayor cantidad de triptófano en dos gramíneas; los mismos autores, señalan que se puede incrementar la producción en 36% comparado con la fertilización química. Fischer *et al.* (2007), señalan que varios mecanismos se han propuesto para explicar cómo las bacterias promotoras del crecimiento vegetal estimulan el crecimiento de la planta, los cuales pueden dividirse en directos e indirectos. Los directos se producen cuando los metabolitos o compuestos sintetizados son proporcionados a las plantas: fitohormonas ó cuando las bacterias facilitan la absorción de nutrientes a la planta (indirectos). Muchas bacterias promotoras del crecimiento vegetal contienen la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilasa (ACC) desaminasa, que hidroliza la ACC (precursor del etileno) y que reduce el nivel de elaboración de etileno en la planta.

3.1.11. Producción de Indoles

Hernández *et al.* (2004), indican que las rizobacterias contribuyen a la producción de indoles los cuales promueven el desarrollo y rendimiento de diversas especies de importancia económica, además, combaten a patógenos de estos cultivos. Lara *et al.* (2011), evaluaron el potencial de bacterias nativas como promotoras del crecimiento vegetal y mencionan que son alternativa para incrementar el aporte nutricional a las plantas; además, secretan reguladores de crecimiento (auxinas), aumentando la germinación de semilla, nutrición, desarrollo de raíz, entre otros. Sánchez *et al.* (2012), señala que la producción de auxinas por bacterias, principalmente ácido indolacético, influye positivamente el crecimiento y desarrollo vegetal, además, indican que el proceso de elongación, puede estar relacionado con producción de

metabolitos secundarios benéficos: fitohormonas, sideróforos o solubilizadores de fósforo inorgánico, incrementando su disponibilidad para la planta. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar morfológicamente cepas de vida libre fijadoras de Nitrógeno atmosférico, asociadas con pastos nativos de las zonas áridas de México.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Área de estudio

El experimento se realizó en el área de Bacteriología del Programa de Fitopatología, del *Campus* “Montecillo” del Colegio de Posgraduados, Km 36.5, carretera México-Texcoco, Texcoco, Estado de México (19° 27' Norte y 98° 54' Oeste), a 2220 msnm, clima Cw, el menos seco de los áridos con lluvias en verano, temperatura media anual de 14.6 °C y precipitación media anual de 500 mm (García, 2005). Se tomaron muestras de suelo de la rizosfera en donde se desarrolla de forma natural *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., de cinco localidades, las cuales se tamizaron en malla de 2 mm hasta obtener aproximadamente 1 kg de suelo tamizado.

3.2.2. Evaluación de bacterias de la rizosfera de pasto Banderita, de las diferentes localidades

Para estimar la población de bacterias totales por localidad se pesaron 10 g de suelo, bajo condiciones de asepsia, se vertieron en botella de dilución con 90 ml de agua destilada estéril, la cual se agito vigorosamente durante 2 min y, de esta dilución (10^{-1}), se tomaron 10 ml, para realizar diluciones seriadas con base 10 (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} y 10^{-10}). Para determinar la población de bacterias totales, se tomó de las concentraciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} una alícuota de 0.1 ml y se vertió sobre placas con medio de cultivo gelificado, para bacterias totales, en agar nutritivo (20 g l⁻¹: 5 g l⁻¹ de peptona de carne, 3 g l⁻¹ de extracto de carne y 12 g l⁻¹ de agar-agar) y se distribuyó uniformemente con varilla de vidrio; se prepararon cinco repeticiones por dilución. La siembra en placas se incubó a 30 °C. Las *ufc* se cuantificaron a 24, 48 y 72 h, mediante el método de dilución en placa.

3.2.3. Aislamiento y caracterización morfológica de bacterias fijadoras de Nitrógeno de vida libre, promotoras del crecimiento, de pasto Banderita

Las bacterias que crecieron, se aislaron en placa con medio de agar nutritivo mediante estria cruzada, para mantener la cepa pura previamente identificada; las cuales, se incubaron a 30 °C por 72 h, una vez desarrollada la colonia, dependiendo de la velocidad de crecimiento, se identificaron morfológicamente, considerando forma, elevación, borde, textura y color (Cuadro A1; Seeley y VanDemark, 1972; Carpenter, 1977); de cada cepa reaislada, se sembraron en tubos con medio de cultivo de 7 ml, con 3 ml de medio de cultivo agar nutritivo.

3.2.4. Evaluación de la capacidad para fijar Nitrógeno de bacterias aisladas de la rizosfera de pasto Banderita, de diferentes localidades

Cada colonia pura se resembró en medio de cultivo NFB (Cuadro A2) para *Azospirillum* (Döbereiner y Day, 1974). Las colonias que crecieron nuevamente en medio NFB fueron resembradas tomando una asada por colonia y colocándola en botellas de 60 ml, las cuales contenían 5 ml de medio NFB gelificado, las botellas se taparon con gasa y algodón y se incubaron a 30 °C 5 días. Para comprobar que las cepas seleccionadas pertenecían al género *Azospirillum* se preparó otro medio de cultivo conteniendo Rojo Congo (Cuadro A3).

3.2.5. Caracterización de bacterias fijadoras de Nitrógeno de vida libre, mediante microscopía electrónica de barrido

Se cortaron fragmentos de 6 x 6 mm de agar con bacterias de 1 día de siembra; dichas muestras, se fijaron en glutaraldehído 2.5% en amortiguador de fosfatos Sorensen's 0.1M pH 7.2 (Bozzola y Rusel, 1999), durante 24 h. Posteriormente, se realizaron tres lavados seriados con el amortiguador de fosfatos mencionado, 5 minutos en cada cambio. Los fragmentos se deshidrataron en serie de etanoles graduales (30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % 90 % y tres cambios en etanol al 100 %), por 40 min, en cada cambio. Las muestras se secaron en secadora de punto crítico (Sandri-780A), se colocaron y orientaron en porta-muestras usando cinta doble adhesiva de carbón y se recubrieron con oro durante 4 minutos en ionizadora (Ion Sputter JFC-1100, Jeol, Fine Coat). Las muestras se observaron y fotografiaron en Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JSM 6390), operando a 15 Kv.

3.3. Análisis Estadístico

La información obtenida se sometió a análisis de varianza utilizando un diseño completamente al azar, empleando el procedimiento de GLM y pruebas de Tukey ($P < 0.05$) para comparar medias entre tratamientos, mediante el paquete estadístico SAS (SAS, 2003).

3.4. Resultados y Discusión

3.4.1. Población de bacterias

Se aisló un total de 489 cepas, las cuales se resembraron en placas Petri y tubos con medio de cultivo y estos últimos se tienen como resguardo; de este total de bacterias, 120, 69, 112, 137 y 51 pertenecieron a las localidades 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. De 489 cepas aisladas, 440 crecieron en medio NFb específico para *Azospirillum*; posteriormente, se seleccionaron 129 cepas en base a velocidad de crecimiento; de las cuales, 28, 22, 30, 27 y 22 corresponden a las localidades 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. A estas 129 cepas, se les realizó confirmación con medio de cultivo Rojo Congo en el cual crecieron 25 cepas; las cuales, se caracterizaron de acuerdo a su forma, elevación, borde, textura y color en agar nutritivo (Cuadro A4).

3.4.2. Caracterización morfológica de bacterias fijadoras de Nitrógeno

De las 25 cepas caracterizadas, 6, 4, 10, 2 y 3 cepas fueron de las localidades 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente y, de estas últimas, se seleccionaron 5 cepas, 1 cepa de la localidad 2 (a66), 2 cepas de la localidad 3 (I27 y I95), 1 cepa de la localidad 4 (S73) y 1 cepa de la localidad 5 (ZA40). Pérez y Casas (2005), observaron que en *Azospirillum* todas las cepas presentaron la forma circular, variaron de planas a convexas, la superficie fue de lisa a rugosa, en todas se observaron bordes enteros y fluctuaron de opacas a brillosas, además, todas presentaron gránulos y fluyeron de muy motiles a lentas y todas fueron Gram negativas.

3.4.3. Caracterización de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, de vida libre, mediante microscopía electrónica de barrido

Se observaron diferencias en características de diferentes cepas evaluadas (Figuras 3.2; 3.3; 3.4; 3.5; 3.6; 3.7 y 3.8). La cepa a66 presentó forma de bacilos cortos, no se observó tendencia para la organización de las bacterias (Figura 3.2B); además, presentan un tipo de red que van acomodando a las bacterias, probablemente esta red les sirva para la protección (Figura 3.2A).

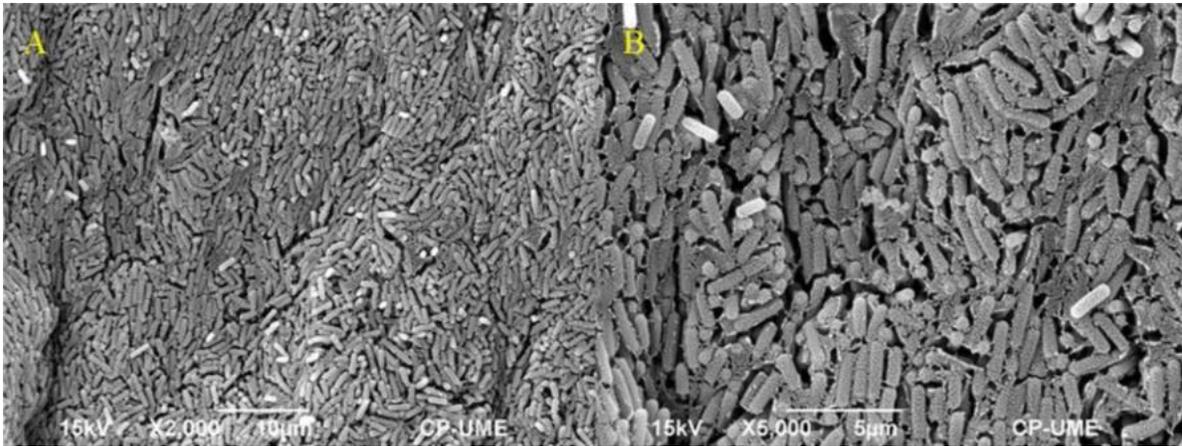


Figura 3.2. Ceba a66 mostrando organización tipo red en microscopía de barrido. 3.2A, (2000x); 3.2B (5000x).

Es notoria la conformación de arreglos de tipo red en ambos aumentos; sin embargo, el arreglo no presenta tendencia.

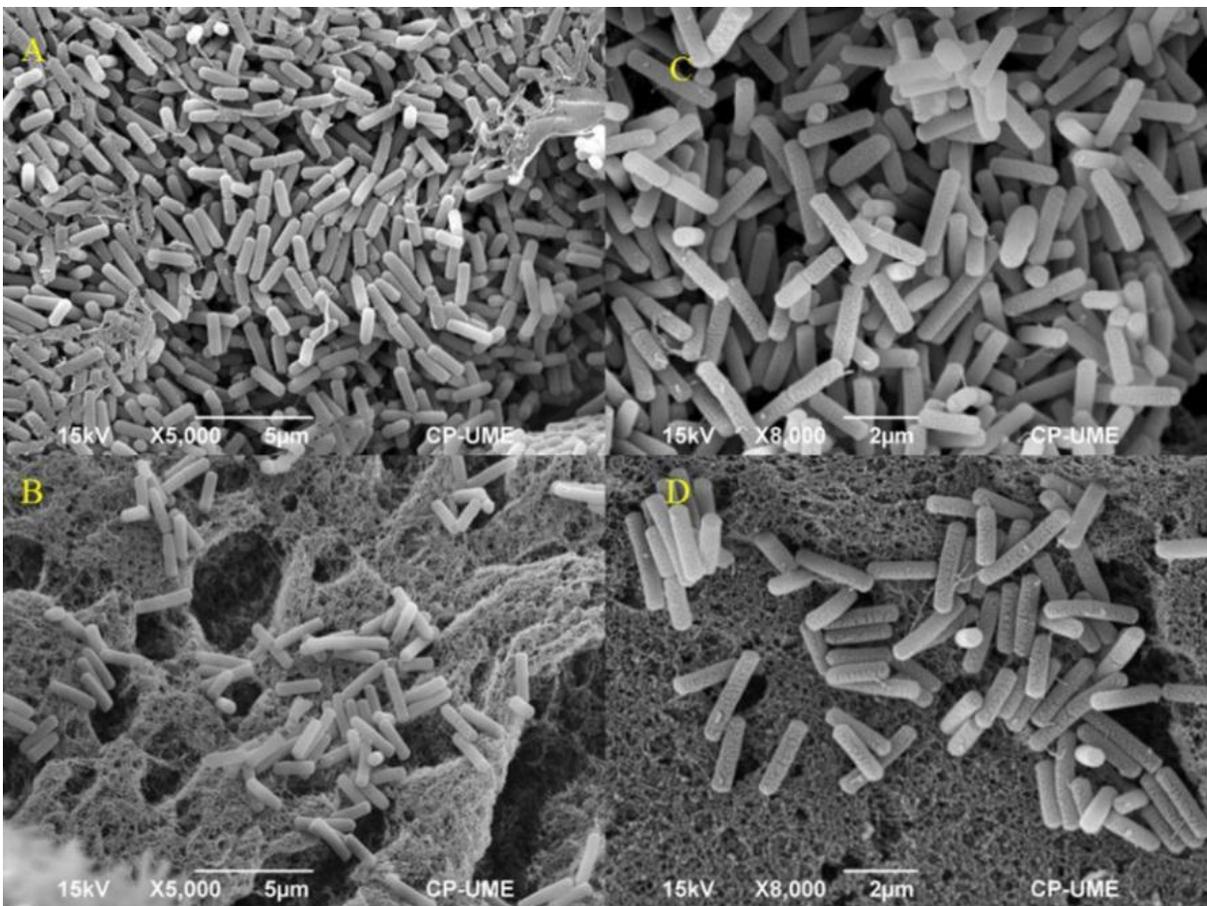


Figura 3.3. Caracterización en microscopio electrónico de la Ceba a66. 3.3A y 3.3B a 5000x y 3.3C y 3.3D a 8000x. Esta cepa presenta bacilos cortos.

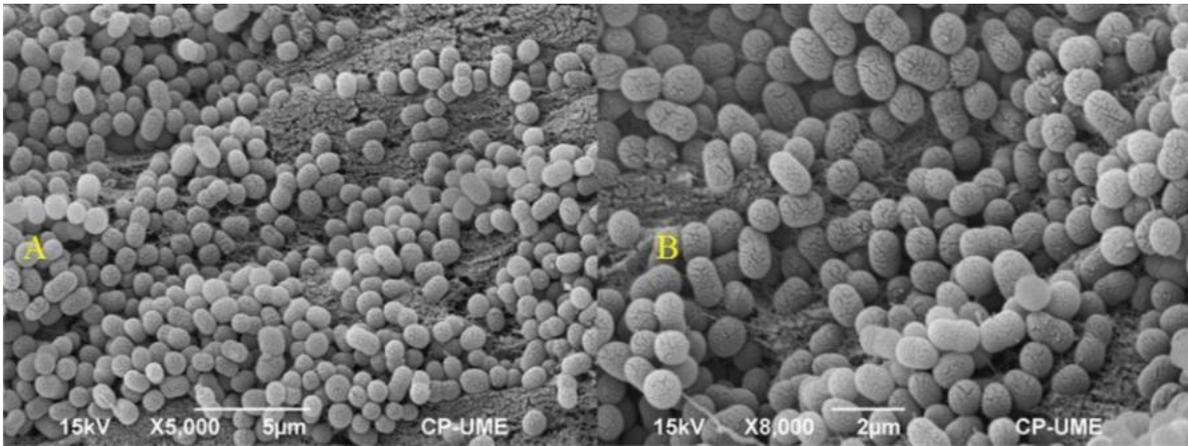


Figura 3.4. Características de la Ceba I27 observada en microscopio de barrido. 3.4A y 3.4B las bacterias se observaron a 5000x y 8000x, respectivamente. Esta bacteria presenta la forma de tipo coco, con algunas grietas en su borde.

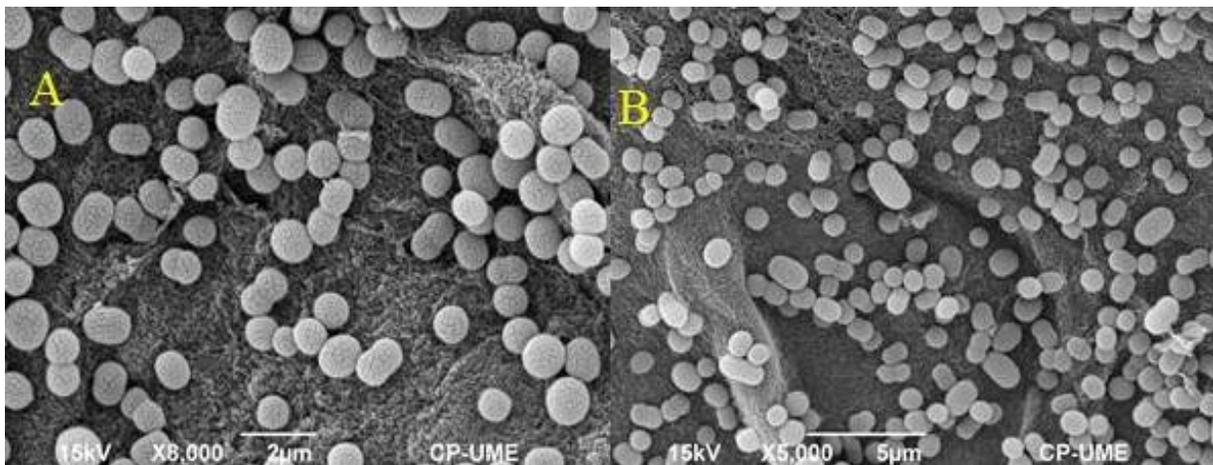


Figura 3.5. Caracterización en microscopio electrónico de la Ceba I95. 3.5A y 3.5B las bacterias se observaron a 8000x y 5000x, respectivamente. Esta bacteria presenta la forma de tipo coco, con grietas en su borde.

La cepa a66 presenta forma de bacilos cortos y no tiene tendencia para la organización de las colonias bacterianas (Fig. 3.3B). Probablemente esta red le sirva de protección, para su crecimiento y sobrevivencia. La cepa I27 presentó forma de coco; además, se encontró que

ésta forma grietas en su pared. En esta bacteria y la I95 no se observó que formaran un tipo de red como se observa en la cepa a66, S73 y ZA40.

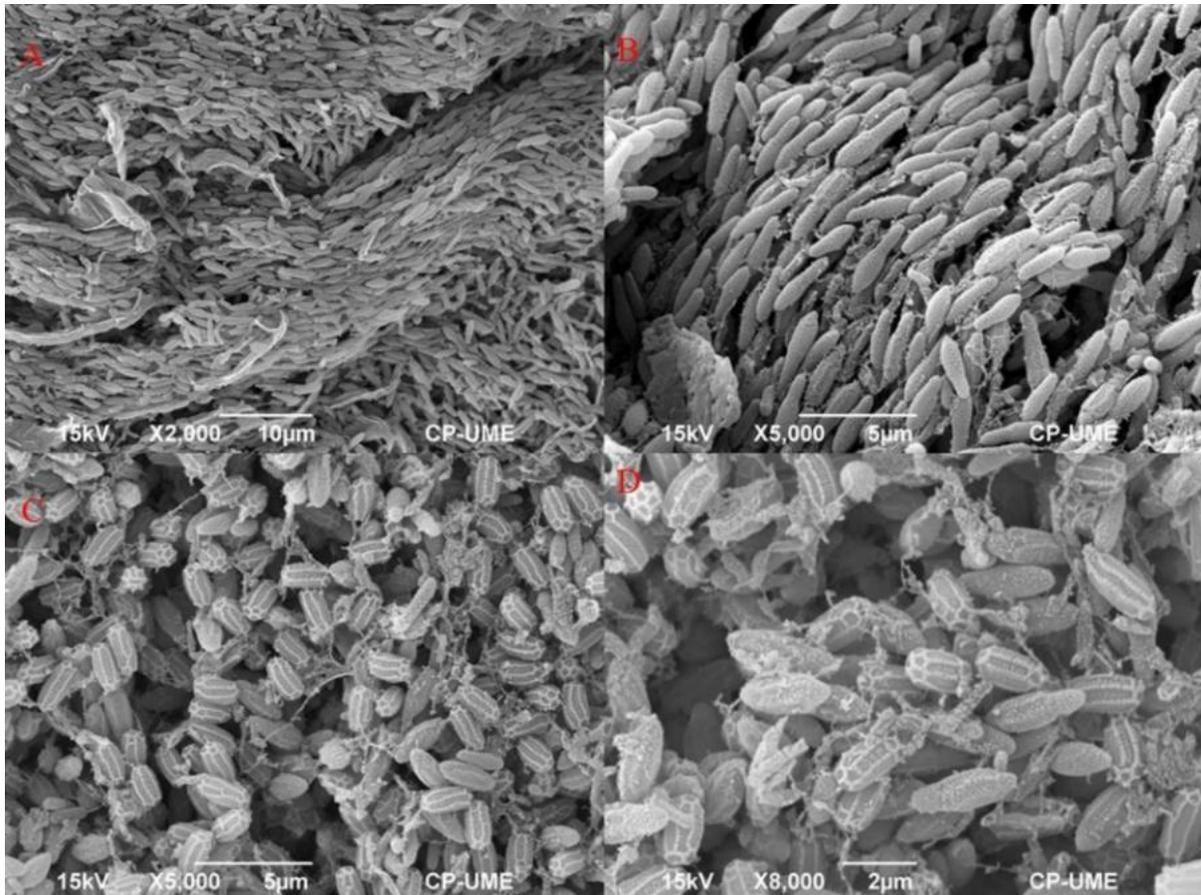


Figura 3.6. Caracterización en microscopio electrónico de la Cepa S73. 3.6A las bacterias se observaron a 2000x, en la 3.6B y 3.6C se observaron a 5000x y en la 3.6D se observaron a 8000x. Esta cepa presenta la forma de bacilos; sin embargo, cuando madura la cubre una red formando como una sandía.

La cepa S73 mostró forma de bacilo delgado y una tendencia a organizarse formando crestas entrelazadas formando una red (Figura 3.6A), conforme va madurando la bacteria, los bacilos (Figura 3.6B) tienden a enrollarse con la red que forman y así cubrirse (Figura 3.6C). Una vez madura la bacteria, los bacilos son cortos y están cubiertos con su red, con la forma y la figura de sandía (Figura 3.6D).

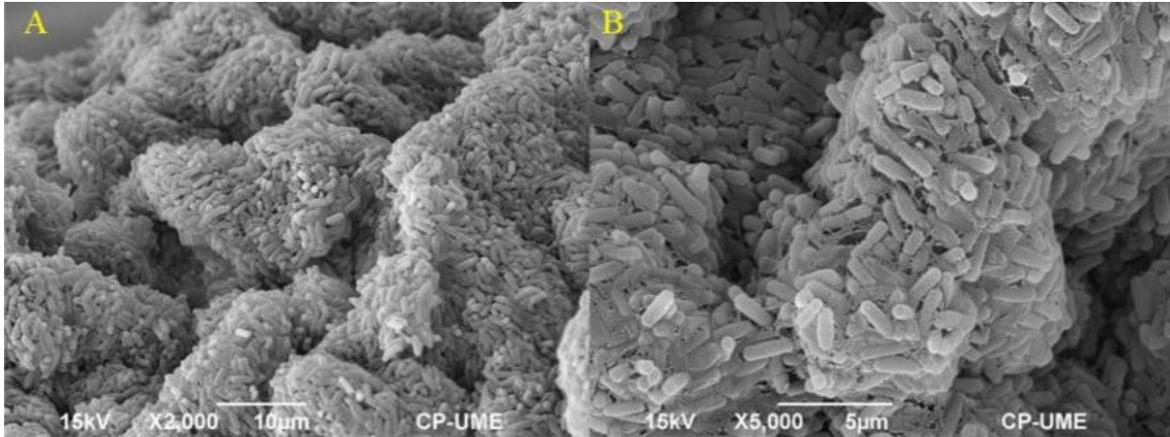


Figura 3.7. Características de la Cera ZA40 observada en microscopio de barrido. 3.7A, las bacterias se observaron a 2000x y en la 3.7B, a 5000x.

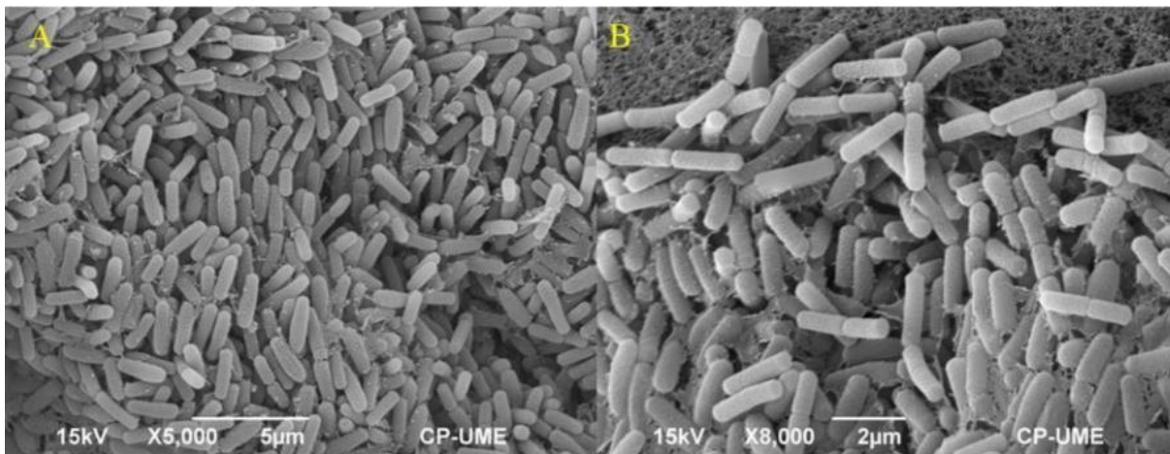


Figura 3.8. Caracterización en microscopio electrónico de la Cera ZA40. 3.8A y 3.8B, las bacterias se observaron a 5000x y 8000x, respectivamente.

Las bacterias no tendieron a organizarse; sin embargo, su red presenta crestas, donde probablemente, este tipo de protección se desarrolla en la parte interna (Figura 3.7). Las bacterias presentaron forma de bacilos cortos y, similarmente, forman una especie de red (Figura 3.8A; 3.8B). Pérez y Casas (2005), trabajando con bacterias y fijación biológica de Nitrógeno observaron células en forma de bacilos gruesos simples o dobles, bacilos alargados simples o dobles y bacilos cortos y medianos, con extremos puntiagudos y movimiento espiral. El tamaño de las bacterias observadas tuvieron rango de 0.8 a 1.5 μm ; por su parte, Vallejo *et al.* (2008), trabajando con la diversidad genética de *Azospirillum* mencionan que 78% de las cepas aisladas presentaron forma de coco y, el 22% restante, forma de bacilo.

3.5. Conclusiones

Las cepas seleccionadas presentaron características morfológicas y microscópicas diferentes y constituyen una opción para ser utilizadas como promotoras del crecimiento vegetal.

3.6. Literatura Citada

- Acebo, Y., N. Rives., M. Heydrich., A. Hernández. 2007. Efecto promotor del crecimiento vegetal de cepas de *Azospirillum* sp., en el cultivo del arroz. *Cultivos Tropicales* 28(3): 29-32.
- Adesemoye, A. O., H. A. Torbert and J. W. Kloepper. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb Ecol* 58:921-929.
- Baca, B. E., L. Soto, M. P. Pardo. 2000. Fijación biológica de nitrógeno. *Elementos* 38: 43-49.
- Bashan, Y., M. E. Puente, M. N. Rodríguez-Mendoza, 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. *Applied and Environmental Microbiology* 61(5): 1938-1945.
- Beegle, D. 2004. Notas del curso "Nutrient management in agricultural systems (An Sc 418)". Department of Dairy and Animal Science. Penn State University. State College, PA. U.S.A.
- Bozzola, J. J and L. D. Russell. 1999. *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*. 2^{da}. Ed. Jones and Bartlett Publishers, Boston. 670p.
- Carcaño-Montiel, M. G., R. Ferrera-Cerrato, J. Pérez-Moreno, J. D. Molina-Galán y Y. Bashan. 2006. Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. *Terra Latinoamericana* 24(4): 493-502.
- Cárdenas, D. M., M. F. Garrido, R. R. Bonilla y V. L. Baldani. 2010. Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* spp. en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar. *Pastos y Forrajes* 33(3): 1-17.

- Cárdenas-Navarro, R., J. M. Sánchez-Yáñez, R. Farías-Rodríguez y J. J. Peña-Cabriales. 2004. Los aportes del nitrógeno en la agricultura. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 10(2): 173-178.
- Carpenter, P. L. 1977. *Microbiology*. 4^{ta}. Ed. W. B. Saunders Company. Philadelphia. E.U.A. 512p.
- Celaya-Michel, H y A. E. Castellanos-Villegas. 2011. Mineralización de nitrógeno en el suelo de zonas áridas y semiáridas. *Terra Latinoamericana* 29(3): 343-356.
- Döbereiner, J. and D. J. Day. 1974. Associative symbiosis in tropical grasses of microorganisms and dinitrogen fixing site. *In* Newton, W; Nyam, CJ. (eds.). *Proceedings of the 1st. International Symposium on Nitrogen Fixation*. Washington State University Press. Pullman, USA. 2: 518-539.
- Elizondo, S. J. 2006. El nitrógeno en los sistemas ganaderos de leche. *Información Técnica. Agronomía Mesoamericana* 17(1): 69-77.
- Fischer, S. E., S. I. Fischer, S. Magris and G. B Mori. 2007. Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere of wheat. *World Microbiol Biotechnol* 23: 895-903.
- Flores-Márquez, J. P., M. Z. Poncio-Acosta, E. Salas-Galván, F. Pérez-Casio, A. Y. Corral-Avitia, E. Salazar-Sosa y H. I. Trejo-Escareño. 2010. Mineralización de nitrógeno en biosólidos estabilizados con cal. *Terra Latinoamericana* 28: 307-317.
- García, E. 2005. *Modificación al sistema de clasificación climática de Köppen*. 4^a. Edición. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México.
- García, O. J. G., V. R. Moreno, I. C. Rodríguez, A. Mendoza y N. Mayek. 2006. Biofertilización con *Azospirillum brasilense* en sorgo, en el norte de México. *Agricultura Técnica en México* 32(2): 135-141.
- García-Olivares, J. G., V. R. Moreno-Medina, I. C. Rodríguez-Luna, A. Mendoza-Herrera y N. Mayek-Pérez. 2007. Efecto de cepas de *Azospirillum brasilense* en el crecimiento y rendimiento de grano de maíz. *Rev. Fitotec. Mex* 30(3): 305-310.
- Garrido, M. F., D. M. Cárdenas, R. R. Bonilla y V. L. Baldani. 2010. Efecto de los factores edafoclimáticos y la especie de pasto en la diversidad de bacterias diazotróficas. *Pastos y Forrajes* 33(4): 1-11.
- Geissen, V and G. Morales. 2006. Fertility of tropical soils under different land use systems. A case study of soils in Tabasco, México. *Applied Soil Ecology* 31: 169-178.

- Grageda-Cabrera, O. A., A. Díaz-Franco, J. J. Peña-Cabriales y J. A. Vera-Nuñez. 2012. Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3(6): 1261-1274.
- Guzmán, A., M. Obando, D. Rivera y R. Bonilla. 2012. Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). *Rev. Colomb. Biotecnol* 14(1): 182-190.
- Hernández, A., N. Rives, A. Caballero, A. N. Hernández y M. Heydrich. 2004. Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz en la producción de metabolitos del tipo AIA, sideróforos y ácido salicílico. *Revista Colombiana de Biotecnología* 6(1): 6-13.
- Kennedy, I. R., A. T. M. A. Choudhury and M. L. Keeskés. 2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 1229-1244.
- Lara, M. C., L. E. Oviedo y C. A. Betancur. 2011. Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar los pastos. *Zootecnia Tropical* 29(2): 187-194.
- Lucy, M., E. Reed and B. R. Glick. 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. Review. *Antonie van Leeuwenhoek* 86: 1-25.
- Luna, M. L., R. A. Martínez, M. Hernández, S. M. Arvizu y J. R. Pacheco. 2013. Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Rev. Fitotec. Mex* 36(1) :63-69.
- Nannipieri, P and P Eldor. 2009. The chemical and functional characterization of soil N and its biotic components. Review Papel. *Soil Biology & Biochemistry* 41: 2357-2369.
- Obando, C. D. M., L. B. Burgos, D. M. Rivera, M. F. Rubiano, V. L. Divan y R. R. Bonilla. 2010. Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al Eucalipto (*Eucalyptus* spp.) en Codazzi, Cesar (Colombia). *Acta Biol. Colomb* 15(3): 107-120.
- Parra, Y y F. Cuevas. 2001. Potencialidades de *Azospirillum* como inoculante para la agricultura. Revisión bibliográfica. *Cultivos Tropicales* 23(3): 31-41.
- Pazos, M y A. Hernández. 2001. Evaluación de cepas nativas del género *Azospirillum* y su interacción con el cultivo de arroz. *Cultivos Tropicales* 22(4): 25-28.

- Pérez G., G. Gómez, M. C. Nápoles y B. Morales. 2008. Aislamiento y caracterización de cepas de rizobios aislados de diferentes leguminosas en la región de Cascajal, Villa Clara. *Pastos y Forrajes* 31(2): 151-160.
- Pérez, J y M. Casas. 2005. Estudio de la interacción planta-*Azospirillum* en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum* sp.). *cultivos Tropicales* 26(4): 13-19.
- Pool-Novelo, L., A. Trinidad-Santos, J. Etchevers-Barra, J. Pérez-Moreno, y A. Martínez-Garza. 2000. Mejoradores de la fertilidad del suelo en la agricultura de ladera de los altos de Chiapas, México. *Agrociencia* 34: 251-259.
- Rebolledo, R. H. H. 1998. Estimación de diferentes modelos de regresión a experimentos de fertilización y su comparación con fines de generar recomendaciones optimas económicas. I. caso con un factor. *Terra Latinoamericana* 16(3): 247-258.
- Rives, N., Y. Acebo y A. Hernández. 2007. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) perspectivas de uso en Cuba. *Reseña bibliográfica. Cultivos Tropicales* 28(2): 29-38.
- Rodríguez, C. E. A. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 44(4): 990-991.
- Sampaio, V. S., D. Messias, R. Fiusa, W. Lustrino, V. L. Divan and J. I. Baldani. 2012. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. *Plant Soil* 356: 51-66.
- Sánchez, L. D. B., R. M. Gómez, M. F. Garrido y R. R. Bonilla. 2012. Inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3(7): 1401-1415.
- Seeley, H. W. and P. J. VanDemark. 1972. *Microbes in Action. A Laboratory Manual of Microbiology*. Ed Freeman and Company. 11-20 p.
- Statistical Analysis System (SAS). 2003. *User's Guide: statistics. Version 9.1*. SAS Institute Inc. Cary, NC. USA.
- Terry, A. E., A. Leyva y A. Hernández. 2005. Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Revista Colombiana de Biotecnología* 7(2): 47-54.

- Torriente, D. 2010. Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de caña de azúcar. Perspectivas de su uso en Cuba. Revisión bibliográfica. *Cultivos Tropicales* 31(1): 19-26.
- Valles, de la Mora. B., G. Cadisch y E. Castillo. 2008. Mineralización de nitrógeno en suelos de pasturas con *Arachis pintoii*. *Téc Pecu Méx* 46(1): 91.105.
- Vallejo, M., C. R. Bonilla y L. A. Castilla. 2008. Evaluación de la asociación de bacterias fijadoras de nitrógeno-líneas interespecíficas de arroz-nitrógeno, en Typic haplustalf, Ibagué, Colombia. *Acta Agron (Palmira)* 57(1): 43-49.
- Verma, R., S. K. Chourasia and M. N. Jha. 2011. Population dynamics and identification of efficient strains of *Azospirillum* in maize ecosystems of Bihar (India). *3 Biotech* 1: 247-253.
- Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255: 571-586.

CAPÍTULO IV. INOCULACIÓN DE RECURSOS FORRAJEROS NATIVOS, CON CEPAS NATIVAS FIJADORAS DE NITRÓGENO DE VIDA LIBRE DE ZONAS ÁRIDAS DE MÉXICO

Resumen

Actualmente los recursos genéticos forrajeros nativos se están perdiendo aceleradamente a consecuencia de la presión de uso ejercida sobre los pastizales áridos de México; similarmente, existe amplio desconocimiento por los productores sobre su impacto en los sistemas de producción. Los recursos forrajeros nativos contienen individuos con características específicas sobresalientes y poseen amplia adaptabilidad a condiciones ambientales: sequía, temperaturas invernales, intensidad de precipitación, entre otros aspectos; por ello, es importante seleccionar, conservar, caracterizar y conocer el potencial productivo de la riqueza genética disponible para su utilización en los sistemas de producción. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la inoculación de bacterias fijadoras de Nitrógeno de vida libre sobre la germinación de semillas y producción de forraje de *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr. Se realizaron pruebas para determinar la calidad física de las semillas de los dos genotipos evaluados, genotipo 1 (la Zarca, G1); genotipo 2 (Genotipo 5, G2). Las pruebas de calidad física estuvieron constituidas por: contenido de humedad (CH), pureza física (PF), peso de 1000 semillas (P1000S), peso volumétrico (PV); además, se realizó una prueba fisiológica (germinación estándar) con la inoculación de las bacterias cepa a66 (C1), cepa I27 (C2), cepa I95 (C3), cepa S73 (C4), cepa Za40 (C5), consorcio (C6, mezcla de todas las cepas) y testigo sin inoculación (C7), para determinar la asociatividad bacteria-genotipo; posteriormente, se realizó la inoculación de las bacterias mencionadas con dos genotipos y dosis de inoculación: 0.5 ml (D1) y 1 ml (D2), evaluados en condiciones de invernadero, para determinar altura de planta, peso seco de parte aérea (PSA) y peso seco de raíz (PSR). Desarrollo Vegetal. La calidad física de semilla presentó promedios de 12.4 y 12.4%, 99.7 y 99.2%, 0.664 y 0.523 g y 59 y 56 kg/hL para G1 y G2, y para CH, PF, P1000S y PV, respectivamente. Se observó 78% de germinación en testigo; para C1 y C6 se observó 73 y 75% de germinación, respectivamente. A 80 días después de la siembra (dds), se observaron alturas de 33.2 y 31.4 cm ($P<0.01$) para G1 y G2, respectivamente. Para PSA se obtuvieron valores de 230.4 y 177.0 mg planta⁻¹ ($P<0.01$) para G1 y G2, respectivamente. Para PSR se observó 82.2 y 73.4 mg planta⁻¹ ($P<0.01$) para G1 y G2, respectivamente. Para dosis

85.5 y 73.2 mg planta⁻¹ ($P < 0.01$) para D2 y D1, respectivamente. Las cepas evaluadas promueven crecimiento vegetal de los diferentes genotipos evaluados.

4.1. Revisión de Literatura

4.1.1. Importancia de los biofertilizantes

Para incrementar los rendimientos en cultivos básicos y mantener el equilibrio del ecosistema, existe necesidad de reducir el uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos y remplazarlos por poblaciones de microorganismos diazotróficos con características como biofertilizantes, para recuperar las propiedades de los suelos, deterioradas por el manejo tradicional (Acebo *et al.*, 2007; Guzmán *et al.*, 2012). Adesemoye *et al.* (2009), mencionan que es de importancia la búsqueda de microorganismos que mejoren la fertilidad del suelo disminuyendo el impacto negativo al ambiente, también, los biofertilizantes pueden usarse como un componente en nutrientes integrales en un manejo estratégico. García *et al.* (2007), reportan que los biofertilizantes generalmente no incluyen material biológico nativo, implicando limitaciones técnicas y de adopción por parte de productores. Lo anterior, obliga a realizar estudios de adaptación y eficiencia con cepas nativas. Sampaio *et al.* (2012), indican que el estudio de bacterias promotoras del crecimiento vegetal con habilidad para fijación de Nitrógeno son potencialmente candidatas para su uso como biofertilizantes. Planes *et al.* (2004), señalan que los microorganismos se encuentran en el suelo en cantidades bajas y se pueden incrementar mediante inoculación artificial sin afectar el equilibrio biológico del suelo. Grageda *et al.* (2012), indican al estudiar los biofertilizantes, que se puede englobar gran cantidad de temas, sin embargo, el principal es aquel de interés. La evaluación de biofertilizantes se practica desde hace muchos años y en muchos casos, la respuesta es positiva; sin embargo, en México es necesaria mayor vinculación entre instituciones generadoras de información y productores. Rojas y Moreno (2008), mencionan que los biofertilizantes son productos generados con microorganismos que tienen la facultad de poner a disponibilidad nutrientes a la planta. López *et al.* (2008); Bécquer *et al.* (2011; 2012), indican que es necesario desarrollar la producción de biofertilizantes, sin embargo, para ello se requiere diseñar estrategias y programas de investigación e innovación a corto y mediano plazo, que involucren el aislamiento, evaluación, selección, multiplicación y producción de cepas nativas, para reducir los costos de producción, manteniendo un equilibrio ambiental, constituyendo una alternativa de uso. Lara *et al.* (2011),

mencionan que aplicar biofertilizantes mediante inoculación microbiana en los cultivos va incrementando su uso debido a sustitución parcial o total de fertilizantes químicos. Luna *et al.* (2013), estudiaron la caracterización de rizobacterias aisladas y su efecto en tomate y pimiento, señalando que la utilización de biofertilizantes constituye una opción para incrementar la producción de especies de interés hortícola. Terry *et al.* (2005), indican que es importante conocer los diferentes integrantes de la comunidad microbiana para utilizarlos como inoculantes desde el punto de vista ecológico.

4.1.2. Inoculación con bacterias

Fischer *et al.* (2007), mencionan que la respuesta inmediata de la inoculación en el suelo varía considerablemente y depende del tipo de bacteria, especie de planta, tipo de suelo, población en el inoculante y condiciones ambientales. Ilyas y Bano (2010), indican que aislamiento de *Azospirillum* en condiciones estresantes de humedad, tanto en maceta como en campo, incrementa la tolerancia al estrés hídrico y pueden ser inoculadas para aumentar el crecimiento vegetal en regiones áridas y semiáridas. Carrillo *et al.* (2000), mencionan que con la inoculación con microorganismos benéficos se observa mayor impacto cuando no se realizan adecuadamente prácticas agrícolas en áreas poco fértiles o contaminadas con microorganismos fitopatógenos. Las condiciones óptimas para el cultivo pueden contrarrestar efectos benéficos de interacciones, para ello, hay que determinar, en la práctica y con precisión, hasta qué punto se pueden suplir requerimientos del cultivo con inoculación en semilla de microorganismos selectos. Abril *et al.* (2006), argumentan que la efectividad en la inoculación con *Azospirillum* spp. en condiciones de campo, no son consistentes y un factor determinante para el éxito de la inoculación, es la colonización de la rizosfera por el inoculante.

4.1.3. Evaluación de semilla inoculada

Díaz *et al.* (2001), mencionan que las bacterias de forma general, incrementan el porcentaje de germinación, área foliar, volumen radical y peso, tanto en la parte aérea como de la raíz; sin embargo, por la complejidad en interacciones son necesarios estudios específicos sobre los mecanismos que promueven el crecimiento vegetal. Villegas *et al.* (2010), señalan que *A. halopraeferens* y *Bacillus amyloliquefaciens* son una alternativa para incrementar la germinación de *Prosopis chilensis*, así mismo, contribuyen ampliar el conocimiento del efecto

de la inoculación de nuevos materiales vegetales con potencial de interés socio-económico en regiones con problemas de sequía. Cassán *et al.* (2009), mencionan que es importante conocer la importancia del perfil hormonal de cada bacteria utilizada en la inoculación para aclarar el complejo bioquímico y fisiológico del crecimiento temprano vegetal.

4.1.4. Evaluación en plántula inoculada

Abril *et al.* (2006), indican factores que influyen la heterogeneidad en resultados por inoculación con *Azospirillum*: estrés hídrico y origen de cepas del inoculante. Señalan que en condiciones de estrés, las cepas nativas tienen ventaja al estar adaptadas a determinada región. Sánchez *et al.* (2012), en tomate bajo invernadero, observaron que todas las variables agronómicas que evaluaron incrementaron la respuesta con inoculación. Bécquer *et al.* (2012a; 2012b), han reportado que la inoculación con bacterias fijadoras de Nitrógeno representa una alternativa importante para incrementar el peso seco aéreo, radical, diámetro de la raíz y número de raíces laterales.

4.1.5. Rendimiento de biomasa con cepas inoculadas

Los sistemas de producción basados en gramíneas son extremadamente complejos y sujetos a gran diversidad de prácticas de manejo: especies de pasto en praderas mixtas, densidad de plantas, dinámica de rebrote, intensidad y frecuencia de pastoreo, fertilización, plagas y enfermedades, fecha y cantidad de riego, prácticas para mejorar el suelo, entre algunas.

4.1.6. Recursos genéticos forrajeros nativos

La recolección representativa y eficiente de germoplasma, es clave para iniciar programas de selección en poblaciones nativas de interés (Quero *et al.*, 2003; Morales *et al.*, 2009). Por otro lado, la descripción morfológica es una herramienta confiable para comparar y detectar ecotipos valiosos; además, para conocer relaciones genéticas entre individuos de diversas poblaciones para integrarlos a programas de selección y mejoramiento, reconociendo genotipos superiores y facilitando el avance genético (Morales *et al.*, 2008), lo cual mediante un mejoramiento de la cultura de utilización del recurso por parte de los productores, contribuiría al mejoramiento de la productividad y sustentabilidad de las tierras de pastoreo extensivo en Latinoamérica (Quero *et al.*, 2007).

El género *Bouteloua* es un recurso forrajero nativo con potencial de adaptación y producción sobresaliente en zonas áridas y semiáridas de México. Posee gran variabilidad morfológica, citológica y aptitudes forrajeras valiosas y es necesario reconocer su potencial productivo (Morales *et al.*, 2006; Morales *et al.*, 2007); por su gran diversidad en México, contiene individuos con diversos tipos de reproducción (sexuales y asexuales) y amplia diversidad en niveles de ploidía, entre los más comunes: diploides y tetraploides (Quero *et al.*, 2010).

4.1.7. Tasa de crecimiento del cultivo

Del Pozo *et al.* (2001), mencionan que es importante considerar los múltiples cambios morfológicos y procesos fisiológicos que contribuyen con la respuesta de las plantas durante el ciclo de crecimiento; así mismo, la estructura morfológica es determinante para la formación de biomasa. Zaragoza *et al.* (2009), señalan que el clima influye en la producción de forraje en las regiones agroclimáticas; en donde, es necesario determinar patrones estacionales de crecimiento de plantas forrajeras utilizadas en cada región.

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Pruebas para determinar calidad física de semilla

4.2.1.1. contenido de humedad

El experimento se realizó en el Laboratorio de Semillas del Programa de Recursos Genéticos y Productividad, del *Campus* “Montecillo” del Colegio de Posgraduados. El contenido de humedad de la semilla (CH) se determinó en estufa, en donde se utilizaron 3 g de cariósides, las cuales se depositaron a 130 °C por 1 h, para ello se utilizaron cuatro repeticiones, los resultados se expresaron en porcentaje (ISTA, 2005) y se calculó como sigue:

$$CH(\%) = \frac{(M2 - M3)}{(M2 - M1)} \times 100$$

Donde: CH= contenido de humedad (%); M1= peso del recipiente con tapa (g), M2= peso del recipiente con tapa más peso de la semilla (g), M3= peso del recipiente con tapa más el peso de la semilla después del secado (g).

4.2.1.2. pureza física

Se utilizaron 2 g de cariósides a las cuales se les determinó proporción de semilla pura y materia inerte (semillas rotas, semillas de maleza y residuos de glumas, lemas y paleas). Se usaron tres repeticiones.

4.2.1.3. peso de 1000 semillas

Se obtuvo cuantificando y pesando ocho repeticiones de 100 semillas. Se calculó el coeficiente de variación (CV%), el cual fue menor de 6%, para calcular el P1000S se multiplicó por diez el promedio del peso de 100 semillas en las ocho repeticiones (ISTA, 2005).

4.2.1.4. peso volumétrico

Se determinó mediante el método de probeta, que consistió en pesar muestras de 3 g de semilla, las cuales se depositaron en probeta de 10 ml para determinar el volumen que desplazado por la masa de semilla, se emplearon tres repeticiones, realizando cálculos con la siguiente formula:

$$PV\left(\frac{kg}{hl}\right) = \frac{\text{peso de los cariósides}}{\text{volumen desplazado}} \times 100 = \text{Kg/hl}$$

4.2.2. Ensayo de germinación

4.2.2.1. obtención de inóculo con bacterias promotoras de crecimiento vegetal

El desarrollo de cepas de bacterias se realizó en el área de Bacteriología del Programa de Fitopatología, del *Campus* “Montecillo” del Colegio de Postgraduados; las cinco cepas seleccionadas se identificaron como a66 (C1), de la localidad 2; I27 (C2) y I95 (C3), de la localidad 3; S73 (C4) de la localidad 4; ZA40 (C5), de la localidad 5. Para la preparación del inoculante se vertieron 100 ml con medio líquido NFb en matraz Erlenmeyer de 250 ml cuya composición para 1 l es DL-ácido málico 5 g, CaCl₂ 0.02 g, FeCl₃ 0.01 g, NaCl 0.1 g, KH₂PO₄ 0.4 g, K₂HPO₄ 0.1 g, NaMoO₄ 2H₂O 0.002 g, MgSO₄ 7H₂O 0.2 g, biotina 0.0001, agua destilada 1 l y 2 ml de azul de bromotimol en alcohol al 5% (Döbereiner y Day, 1974); posteriormente, se ajustó a pH 7 y, en condiciones de asepsia, se tomó una asada por cepa y se depositó en matraz y se colocó en agitador Labnet Orbit-1900 a 180 rpm durante 5 d a 25 °C. Se determinó la cuenta bacteriana, la cual fue de 10³/ ml, mediante conteo en placa.

4.2.2.2. desinfección de semilla

Se utilizó semilla del genotipo La Zarca (G1), escarificada manualmente para obtener cariósides, este proceso se realizó hasta obtener suficiente semilla para realizar las pruebas físicas descritas. Los cariósides se desinfectaron superficialmente, sumergiéndolos en etanol al 10%, durante 1 min; posteriormente, se enjuagaron con agua destilada por 3 min y, por último, se colocaron en cajas Sandwicheras para realizar la prueba de germinación.

4.2.2.3. pruebas para determinar calidad fisiológica de semilla: Germinación estándar

Para evaluar la capacidad promotora de las cepas bacterianas se realizaron, en laboratorio, pruebas de germinación (GE) en semillas de *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.; para esto, se cuantificaron cuatro repeticiones de 100 semillas seleccionadas al azar, utilizando papel (ISTA, 2005) que consistió en colocar 100 semillas en cajas Sandwicheras, la semilla se depositó en papel de toallas comerciales “sanitas”, colocadas sobre la superficie plana de dos toallas, previamente humedecidas con agua destilada. Durante la prueba, la temperatura se mantuvo constante a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, el conteo de plántulas germinadas se realizó a 7, 14 y 21 días después de siembra (dds), cuantificando germinación a 7 (G7) y 14 días (G14); similarmente, se contabilizaron plántulas normales (PN), plántulas anormales (PA), semillas duras (SD) y muertas (SM). Las plántulas normales presentaron raíz y plúmula bien desarrollada y sanas. Durante la prueba se revisó la humedad en las cajas Sandwicheras y se aplicó la cantidad de agua, según se necesitaba. La semilla se desinfectó como se describió anteriormente.

4.2.2.4. tratamientos

Constituidos por la combinación: 1) cepa [a66 (C1), I27 (C2), I95 (C3), S73 (C4) y ZA40 (C5), consorcio de las cepas anteriores (C6) y testigo (sin inóculo (C7)]; 2) dosis [0.1 (D1), 0.05 (D2), 0.025 (D3) y 0.01 (D4) ml/semilla]. La semilla se desinfectó. Para D1 se aplicaron solamente 10 ml de caldo nutritivo, sin aplicación de agua destilada, en cajas sandwicheras al inicio del ensayo. Para D2 se aplicaron 5 ml de agua destilada y 5 ml de caldo nutritivo; para D3, se aplicaron 7.5 ml de agua destilada y 2.5 ml de caldo nutritivo y, para D4, se aplicaron 9 ml de agua destilada y 1 ml de caldo nutritivo. En cada caja sandwicheras, se depositaron 100 semillas con cuatro repeticiones.

4.2.2.5. índice de germinación

Se evaluó para determinar semillas germinadas por día, cuantificando a 7 y 14 dds. El número de plántulas germinadas se sumaron a 7 y 14 d y fueron divididas en el tiempo, para estimar número de plántulas germinadas por día, para ambas fechas.

4.2.2.6. análisis de información para germinación

Se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial de tratamientos 6x4 con un testigo, mediante GLM y Tukey ($P<0.05$) para comparar medias entre tratamientos, así como interacciones; previamente, los datos se transformaron al arco seno (SAS, 2003).

4.2.3. Rendimiento de biomasa en pasto Banderita, inoculado con bacterias fijadoras de Nitrógeno de vida libre

La desinfección y pruebas de calidad física de la semilla se determinaron como se describió para el ensayo de germinación.

4.2.3.1. obtención de inoculante

La obtención del inóculo se realizó como se describe para el ensayo de germinación; sin embargo, para este ensayo se usaron 450 ml de medio de cultivo líquido NFb y, bajo condiciones de asepsia, se tomaron nueve asadas, una por cada 50 ml de medio de cultivo y cepa, depositadas por matraz; los cuales, se colocaron en agitador Labnet Orbit-1900, a 180 rpm durante 8 d a 25 °C. Transcurrida la incubación, se determinó la población de las mismas, mediante la escala de McFarland (1970; Cuadro A5) con una población bacteriana de 10^6 / ml.

4.2.3.2. tratamientos

Estuvieron constituidos por la combinación de: 1) cepa [a66 (C1), I27 (C2), I95 (C3), S73 (C4) y ZA40 (C5), consorcio de las cepas anteriores (C6) testigo (sin aplicación del inóculo (C7)]; 2) dosis [0.5 (D1), 1 (D2) ml/tubín]; y 3) genotipo [La Zarca (G1) y 5 (G2)]; para todos los casos, se utilizaron cinco repeticiones. Además, se realizaron cuatro muestreos destructivos cada 14 días. Para eliminar el efecto de tamaño de carióspside, se utilizó tamiz con 0.59 mm de separación y los carióspsides retenidos se utilizaron para la siembra.

4.2.3.3. inoculación de cepas promotoras del crecimiento vegetal

A tubines plásticos con capacidad de 70 cc se les agregó 50 cc de suelo previamente esterilizado; antes de depositar el suelo se les colocó tapón de algodón para evitar pérdida de suelo por el drenaje de éstos (Cuadro 4.1). Se aplicó riego hasta capacidad de campo y se depositó una cariósida por tubin; posteriormente, se aplicó inoculante según tratamiento. Hasta 14 dds, se regó a capacidad de campo; posteriormente, se aplicaron 15 ml por tubin con dosificador; lo anterior, cada tercer día y con agua destilada. La humedad aprovechable se determinó con tensiómetro. El primer muestreo destructivo se realizó 38 dds, se midió altura de planta, se separó la parte aérea de la raíz y ambas se secaron a 55°C hasta peso constante; similarmente, para los muestreos restantes.

4.2.3.4. análisis de información

Para análisis de la información se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos 6x2x2 más el testigo, empleando GLM y Tukey ($P<0.05$) para comparar medias entre tratamientos, así como interacciones (SAS, 2003).

4.2.4. Tasa de crecimiento de forraje

La tasa de crecimiento se estimó cada 14 d con la siguiente fórmula:

$$TC = (MSPt2 - MSPt1) / (T2 - T1);$$

Donde: TC= tasa de crecimiento del forraje ($\text{mg MS planta}^{-1} \text{ día}^{-1}$); MSPt2= materia seca presente en el tiempo 2; MSPt1= materia seca presente en el tiempo 1; T2-T1= número de días transcurridos entre un corte y el siguiente.

4.3. Resultados y Discusión

4.3.1. Pruebas de calidad física de semilla

4.3.1.1. prueba de calidad física de semilla en germinación

Los valores de calidad física de G1 fueron de 12.5% de CH, 97.5% de PF, 0.618 g para P1000S y 56 kg/hL de PV, valores en base a cariósida. Con la eliminación de las brácteas florales un kg de semilla (cariósida) puede tener alrededor de 1,618,122 cariósidas.

4.3.1.2. prueba de calidad física de semilla en ensayo de plántulas

Los genotipos evaluados presentaron valores similares de CH y PF; por el contrario, para P1000S y PV, el G1 mostró mayores valores, aun cuando ambos genotipos se cribaron en malla del #30. Conociendo la calidad física de semilla, se puede almacenar y determinar el número de cariósides por kg (Figura 4.1).

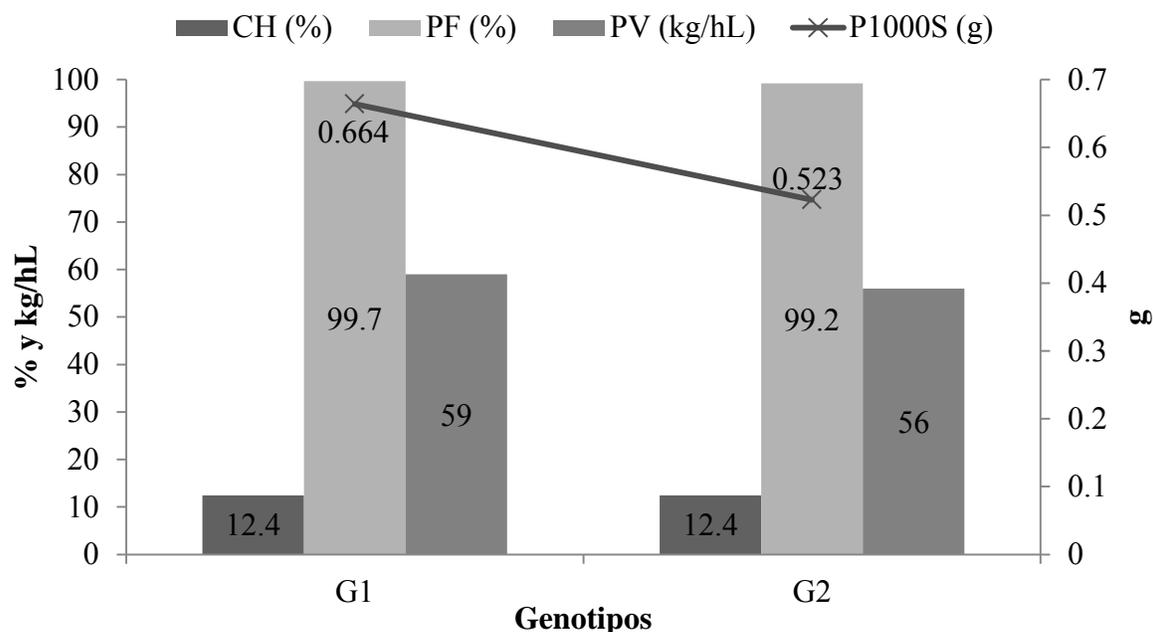


Figura 4.1. Calidad física de la semilla en ensayo de plántulas. CH=contenido de humedad en la semilla (%), PF=pureza física (%), PV=peso volumétrico (kg/hL), P1000S=peso de 1000 semillas (g), G1=genotipo La Zarca, G2=genotipo 5.

4.3.2. Efecto de la inoculación en la germinación de pasto Banderita

Al final del periodo de crecimiento, la coloración del medio de cultivo cambió de acuerdo a la cepa. La coloración del medio de cultivo se mantuvo en a66 e I95, contrariamente a I27, S73 y ZA40, las cuales cambiaron la coloración del medio de cultivo hacia el azul, indicando que el medio cambio de pH de neutro a alcalino. El testigo presentó mayores porcentajes de germinación (76%; $P < 0.01$), respecto a las cepas evaluadas; sin embargo, la cepa con mayores porcentajes de germinación, a 7 dds, fue a66, con 40% (Fig. 4.2). Los mayores porcentaje de germinación a 7 dds se observaron con la aplicación de 0.01 ml de inóculo (59%; $P < 0.01$), con respecto a las dosis evaluadas, indicando que, a menor concentración del inóculo, se incrementa la germinación de la semilla.

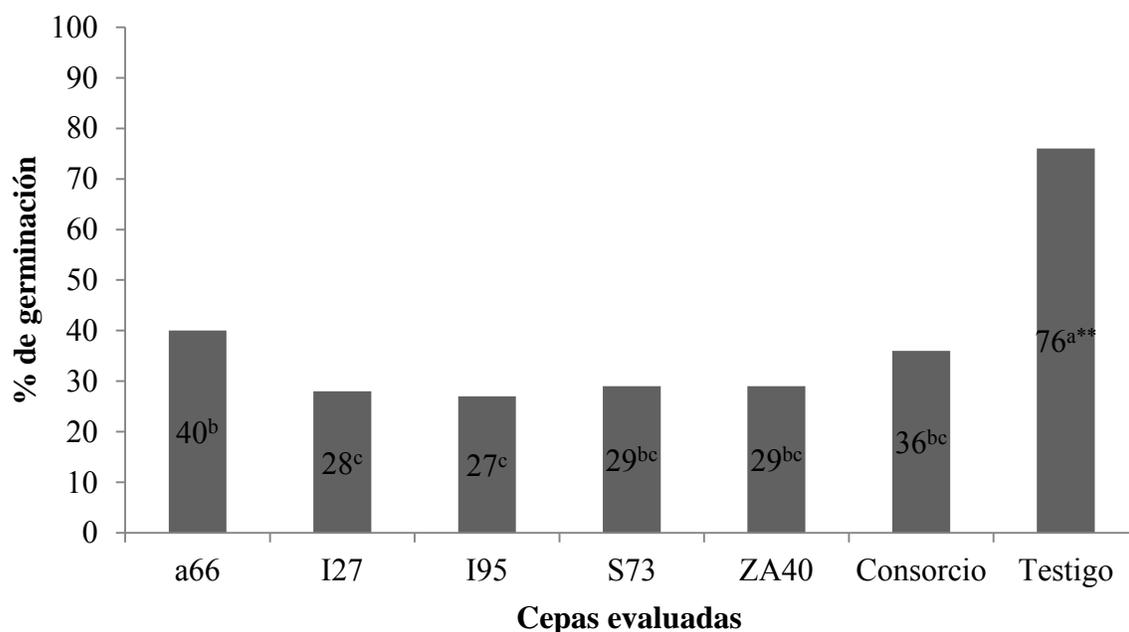


Figura 4.2. Germinación, por cepa evaluada, a 7 después de la siembra. ** Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P<0.01$).

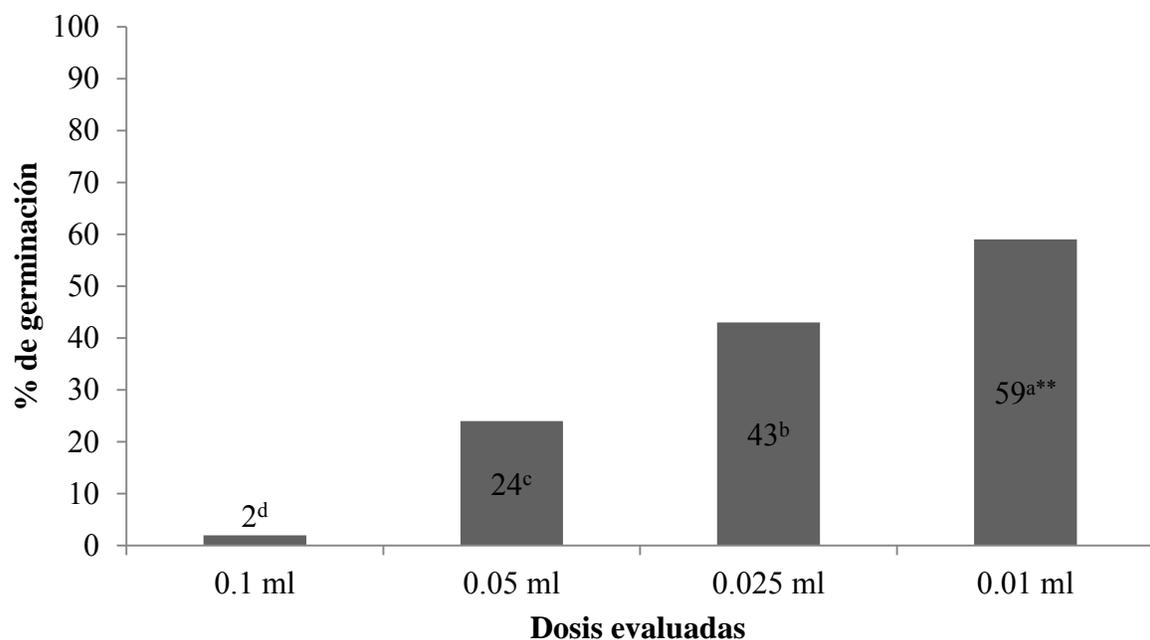


Figura 4.3. Efecto de dosis de inoculación en la germinación de la semilla a los 7 después de la siembra. ** Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P<0.01$).

El consorcio bacteriano presentó las mayores germinaciones (71%; $P<0.01$) en la dosis de 0.01 ml (Fig. 4.4); sin embargo, no se observaron diferencias estadísticas respecto al testigo, el cual, alcanzó 76% de germinación (Fig. 4.2), pero, el testigo fue superior ($P<0.01$) a todas las cepas evaluadas con la aplicación del inóculo de 0.01 ml (Fig. 4.4). No se observaron diferencias significativas (Fig. 4.4) entre el consorcio y las cepas a66, I95 y S73 por el contrario se observaron diferencias ($P<0.01$) con las cepas I27 y ZA40 con la aplicación de 0.01 ml de inóculo. La cepa a66 presentó los mayores porcentajes de germinación con aplicación del inóculo a niveles de 0.05 y 0.025 ml.

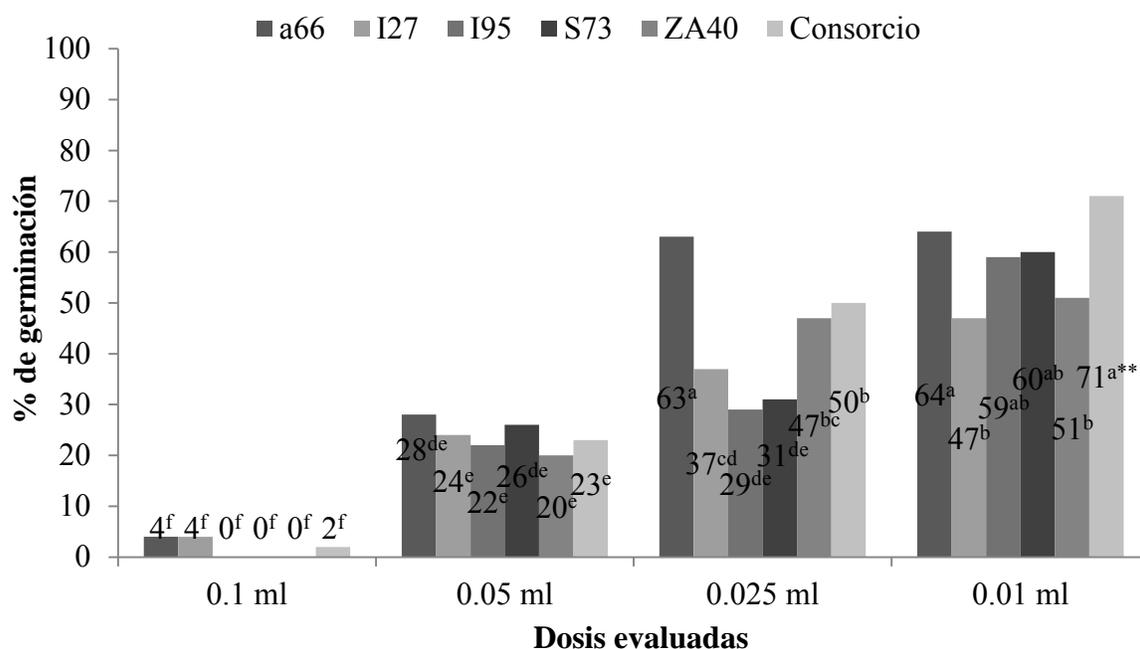


Figura 4.4. Efecto de la interacción cepa por dosis de inoculación, en la germinación a 7 días después de la siembra en pasto Banderita. ** Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P<0.01$).

A 14 días el testigo alcanzó 78% de germinación, superior ($P<0.01$; Fig. 4.5) a las cepas estudiadas. Se puede observar que las cepas que incluyen las diferentes dosis de aplicación, no sobrepasaron 45% de germinación al final de la prueba; sin embargo, la cepa a66 presentó mayores porcentajes (43%), seguida del consorcio (39%). Similarmente, se observaron diferencias ($P<0.05$) en porcentaje de plántulas anormales y el testigo mostró mayor

germinación comparado con las cepas; sin embargo, para semillas duras no se observaron diferencias ($P>0.05$) entre cepas respecto al testigo. Para semillas muertas, I95 presentó mayor porcentaje ($P<0.01$), siendo el testigo el que presentó solo 12%; (Fig. 4.5).

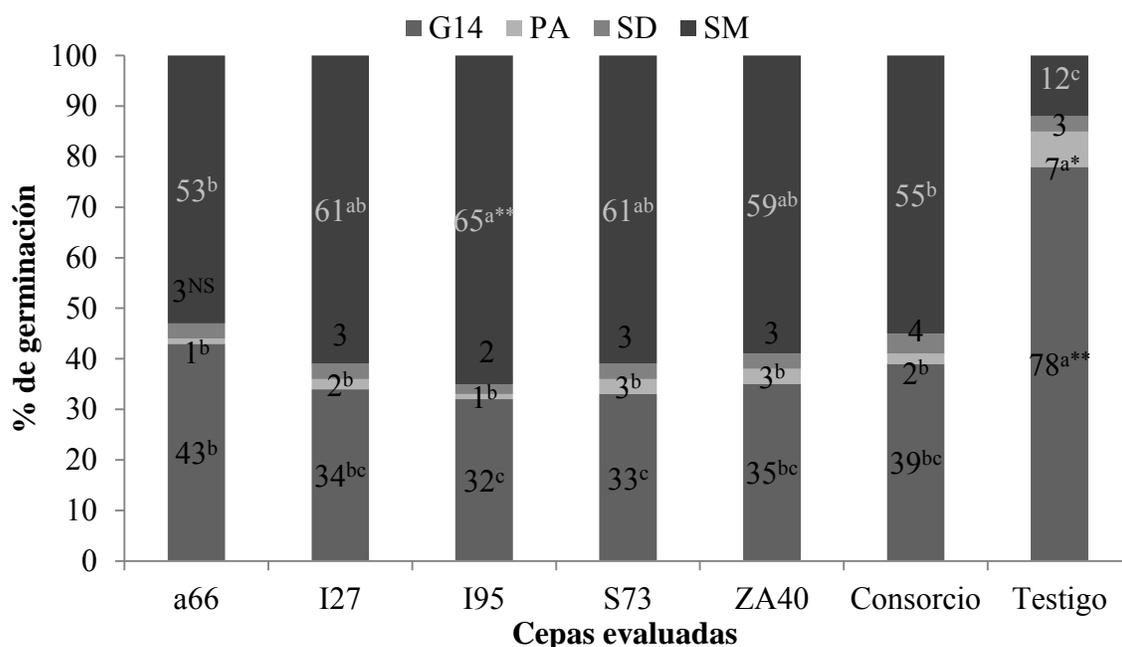


Figura 4.5. Evaluación de cepas a 14 después de la siembra para germinación de pasto Banderita. PA= plántulas anormales, SD= semillas duras, SM= semillas muertas. NS no significativo, * y ** Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P<0.05$) y ($P<0.01$), respectivamente.

Los mayores porcentajes de germinación (69%) corresponden a la dosis 0.01 ml, la cual fue superior ($P<0.01$; Fig. 4.6) comparado con las otras dosis aplicadas. Para plántulas anormales, se obtuvieron diferencias ($P<0.01$) siendo la aplicación de 0.01 ml la que presentó mayor número, comparada a las demás dosis en estudio. Para semillas duras no se encontraron diferencias ($P>0.05$) entre las dosis evaluadas. Por el contrario, se presentaron diferencias ($P<0.01$) en semillas muertas, la aplicación de medio de cultivo con bacterias, mostró mayor cantidad (94%). Es necesario evaluar dosis de inoculación; similarmente, componentes del medio de cultivo para reducir sales que afecten la germinación o viabilidad del embrión.

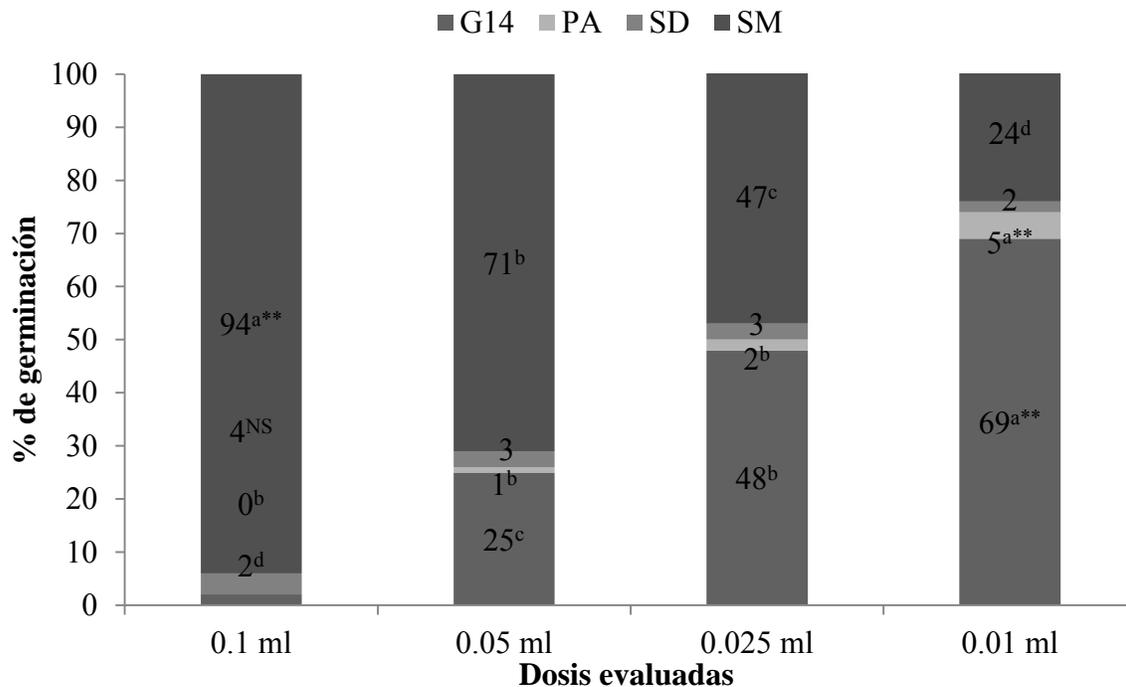


Figura 4.6. Efecto de la dosis inoculada, en la germinación, a 14 después de la siembra. PA= plántulas anormales, SD= semillas duras, SM= semillas muertas. NS no significativo, ** Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P<0.01$).

Los porcentajes de germinación a 14 dds, para la interacción cepa por dosis de inoculación, mostraron que el consorcio, a66, S73 e I95, presentaron los mayores promedios con la dosis de 0.01 ml, los cuales son iguales ($P>0.01$; Fig. 4.7), respecto al testigo. Por otro lado, el testigo fue superior ($P<0.01$) a I27 y ZA40 con inoculación de 0.01 ml y a todas las cepas en las dosis 0.1, 0.05 y 0.025 ml. En la dosis 0.01 ml, la cepa ZA40 presentó diferencias significativas ($P<0.01$; Fig. 4.7; 59%), inferior con relación a las demás cepas; contrariamente, a 0.025 ml, la cepa a66, ZA40 y el consorcio, presentaron mayores germinaciones 64, 58 y 53%, respectivamente ($P<0.01$).

La cantidad de inóculo aplicado afectó la germinación a 14 d de evaluación (Fig. 4.7) y la dosis baja presentó los mayores porcentajes de germinación, para las cepas evaluadas; sin embargo, se encontraron mayores porcentajes de germinación con a66, a 0.05 y 0.025 ml. La dosis 0.01ml, mostró los mayores porcentajes de germinación, a 14 d, para el consorcio, seguido de a66. Es necesario evaluar diferentes dosis para determinar la adecuada para obtener

mayores porcentajes de germinación. Ésto indica que la inoculación con el consorcio, incrementó la germinación de pasto Banderita y, en específico, del genotipo “La Zarca”.

El índice de germinación con las cepas evaluadas a 7 y 14 d mostró diferencias significativas ($P<0.01$; Fig. 4.8), siendo el testigo superior a las diferentes cepas evaluadas (cinco plántulas por día), a los primeros 7 d y, para 14 d, el testigo fue superior ($P<0.01$) a las diferentes cepas con 2.6 plántulas germinadas por día.

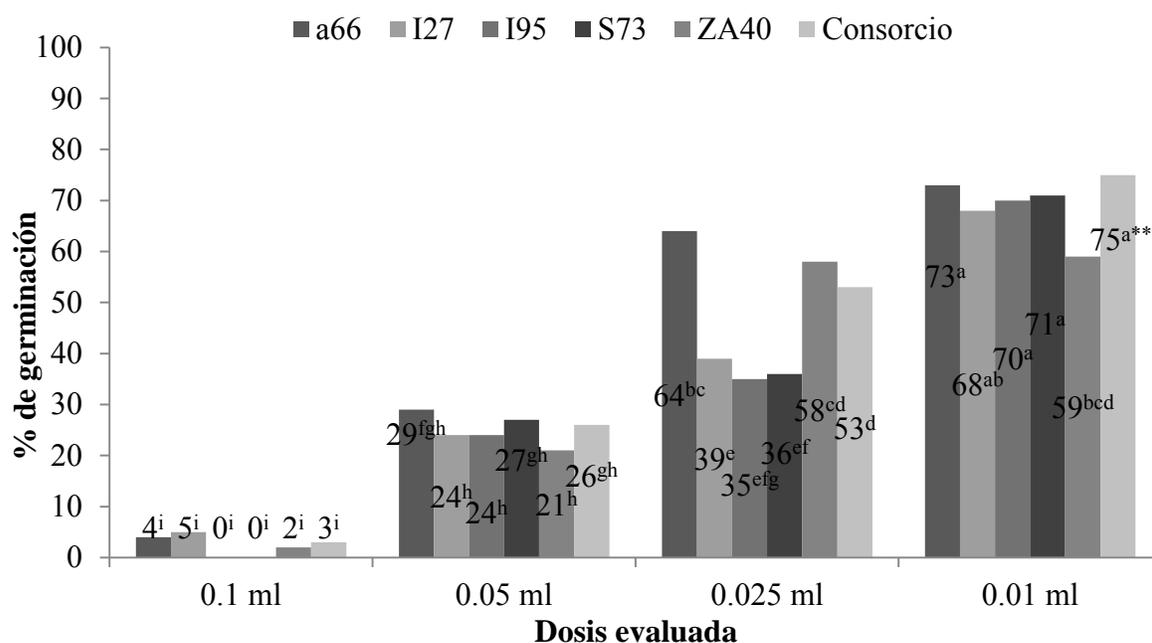


Figura 4.7. Efecto de la interacción cepa por dosis de inoculación a 14 después de la siembra.

** Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P<0.01$).

Los índices de germinación a 7 y 14 dds con las dosis evaluadas, mostraron diferencias significativas ($P<0.01$; Fig. 4.9) y la dosis 0.01 ml presentó valores de 8.2, 4.9 y 2.2 plántulas por día, superiores a 0.1, 0.05 y 0.025 ml, respectivamente, a 7 d. Para el índice de germinación a 14 dds, se observaron diferencias significativas ($P<0.01$) siendo 0.01 ml, superior a las otras dosis con valores de 4.9, 3 y 1.5 plántulas por día, para las dosis 0.1, 0.05 y 0.025 ml, respectivamente. En la interacción cepa por dosis, el consorcio presentó mayor número de plántulas germinadas por día, para 0.01 ml; sin embargo, se observaron diferencias significativas ($P<0.01$; Fig. 4.10), con la cepa I25, I95 y ZA40 a la misma dosis de

inoculación. Se observaron diferencias significativas ($P<0.01$) para 0.025 ml, la cepa a66 presentó los mayores índices de germinación, por el contrario no se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) en 0.05 y 0.1 ml para las cepas evaluadas. Por otro lado, no se encontraron diferencias entre el consorcio con inoculación de 0.01 ml, respecto al testigo; sin embargo, éste fue superior ($P<0.01$) a las demás cepas, con la misma dosis de inoculación.

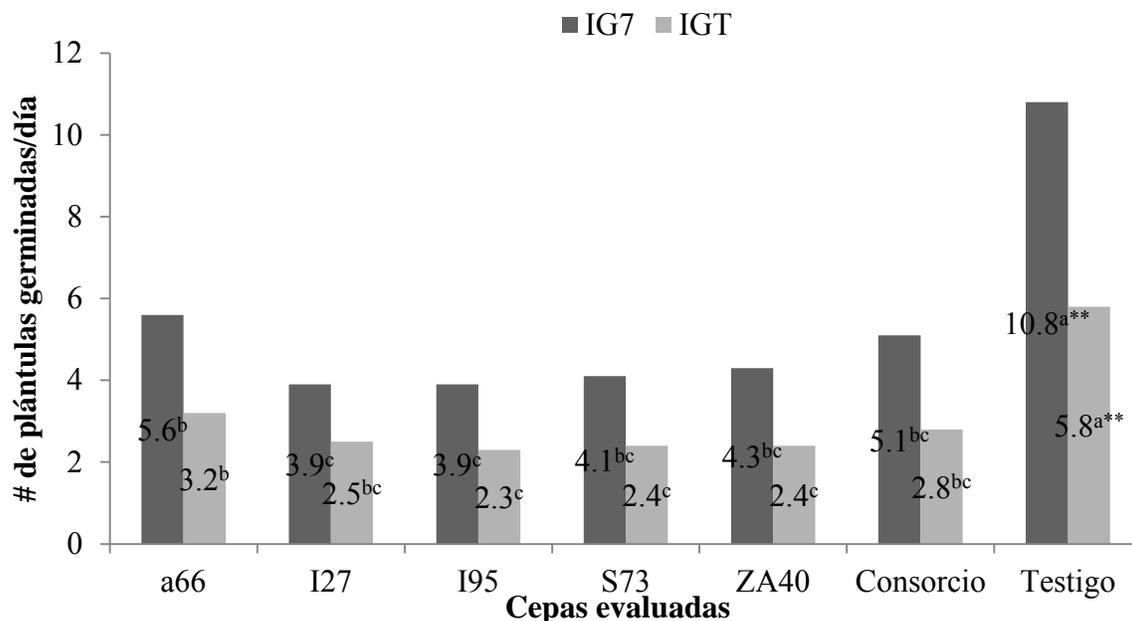


Figura 4.8. Índice de germinación por cepa evaluada a 7 y 14 después de la siembra. IG7= índice de germinación a 7 dds, IGT= índice de germinación a 14 dds. ** Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P<0.01$).

El índice de germinación a 14 dds para la interacción cepa por dosis de aplicación mostró diferencias significativas ($P<0.01$; Fig. 4.11) entre cepas evaluadas a 0.01 ml, siendo la cepa ZA40 la que presentó menor número de plántulas germinadas por día; por otro lado, no se observaron diferencias entre a66, I27, I95, S73 y el consorcio con el testigo; sin embargo, se observaron diferencias significativas ($P<0.01$) entre el testigo y ZA40 a 0.01 ml. La cepa a66 mostró los mayores promedio de plántulas germinadas por día con las dosis 0.05 y 0.025 ml (Fig. 4.11). La cantidad de inóculo aplicado a la semilla mostró influencia en la germinación y desarrollo de plántulas, por tal motivo, es necesario evaluar el efecto de la inoculación en la semilla de pasto Banderita, para determinar la dosis correcta sin dañar a la semilla y su

calidad, para obtener los mayores porcentajes de germinación. López *et al.* (2008), evaluaron el efecto de biofertilizantes bacterianos sobre la germinación de un cultivar de maíz y encontraron 96% cuando utilizaron bacterias fijadoras de Nitrógeno a 8 dds valores de 66 y 64% de germinación, cuando no se inocularon y con la inoculación de bacterias solubilizadoras de fósforo. Estos autores encontraron valores mayores de germinación en suelo de alta fertilidad comparado con el suelo de baja fertilidad a los primeros 4 dds; por otra parte, las mayores germinaciones se presentaron en suelo de baja fertilidad, comparado con el suelo de alta fertilidad a los 8 dds.

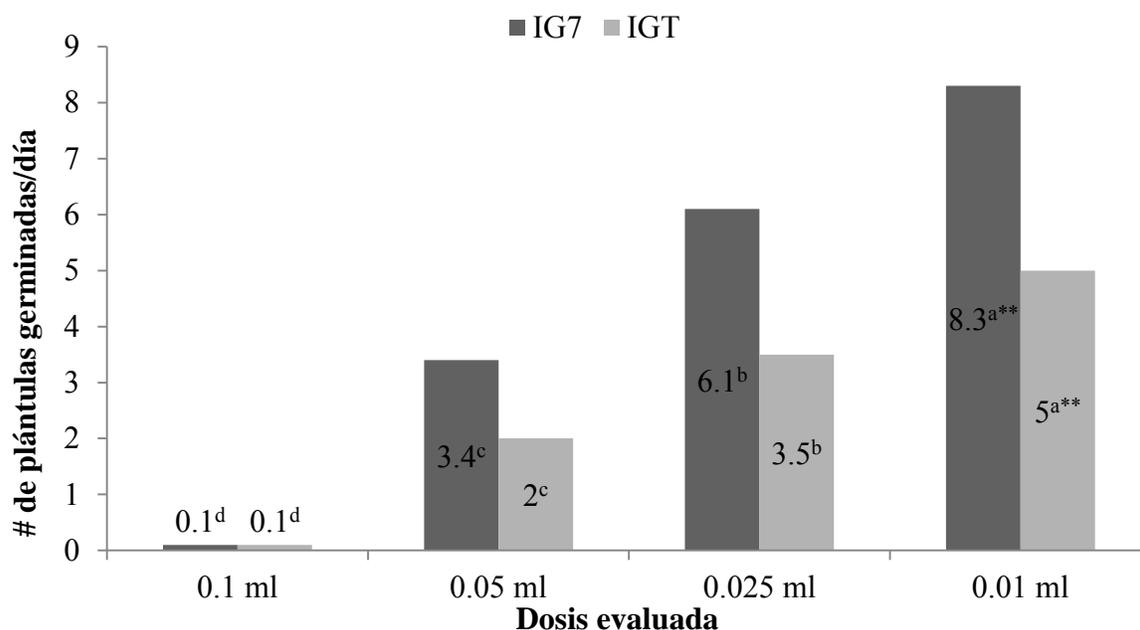


Figura 4.9. Índice de germinación por dosis evaluada a 7 y 14 después de la siembra. IG7= índice de germinación a 7 dds, IGT= índice de germinación a 14 dds. ** Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P<0.01$).

Canto *et al.* (2004), estudiaron el efecto de la inoculación con *Azospirillum* en la germinación de semilla de chile habanero y encontraron 74% de germinación con agua solamente, indicando que la inoculación con *Azospirillum* aceleró en un día la germinación de la semilla. Rueda *et al.* (2009), estudiaron el efecto de la inoculación de bacterias fijadoras de Nitrógeno de vida libre sobre la germinación de *Salicornia bigelvii* y observaron que incrementó el

porcentaje de germinación, comparado con el testigo, en diferentes concentraciones de salinidad.

Díaz *et al.* (2001), evaluaron el efecto de la inoculación en la germinación de lechuga con 30 cepas promotoras del crecimiento vegetal y encontraron que el 77% de las cepas evaluadas aumentaron la germinación, 10% no tuvo efecto y el 13% redujo la germinación, del 77% de las cepas que promovieron la germinación superaron en un 50% al testigo.

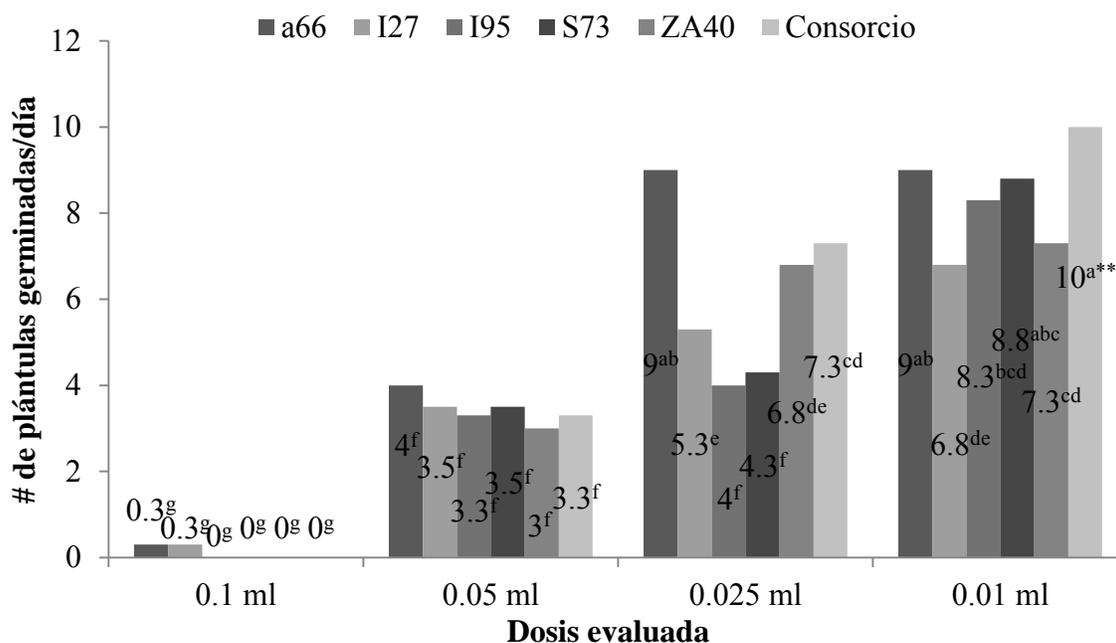


Figura 4.10. Efecto de interacción cepa por dosis de inóculo sobre el índice de germinación a 7 después de la siembra. ** Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P<0.01$).

Barassi *et al.* (2006), evaluaron el efecto de inocular *Azospirillum* sobre la germinación de semilla en lechuga con diferentes concentraciones de NaCl, quienes encontraron que la inoculación incrementó ésta en 10% comparado con el testigo, cuando no se le aplicó ninguna concentración de NaCl; sin embargo, al aumentar las concentraciones de NaCl el porcentaje de germinación descendió. Villegas *et al.* (2010), evaluaron el efecto de la inoculación de *A. halopraeferens* y *Bacillus amyloliquefaciens* en la germinación de *Prosopis chilensis* a los 7 d con varias concentraciones de NaCl bajo condiciones de laboratorio, observaron que el control

presentó mayor porcentaje de germinación (72%) comparado con 40 y 60% para *A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens*, respectivamente, sin ninguna concentración de NaCl; sin embargo, no encontraron diferencias con 0.25 M de NaCl para el testigo y *A. halopraeferens* con valores de germinación de 68% para ambos, *B. amyloliquefaciens* alcanzó 48% de germinación. Al incrementar la concentración de NaCl la germinación disminuyó tanto para el testigo como para *A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens*.

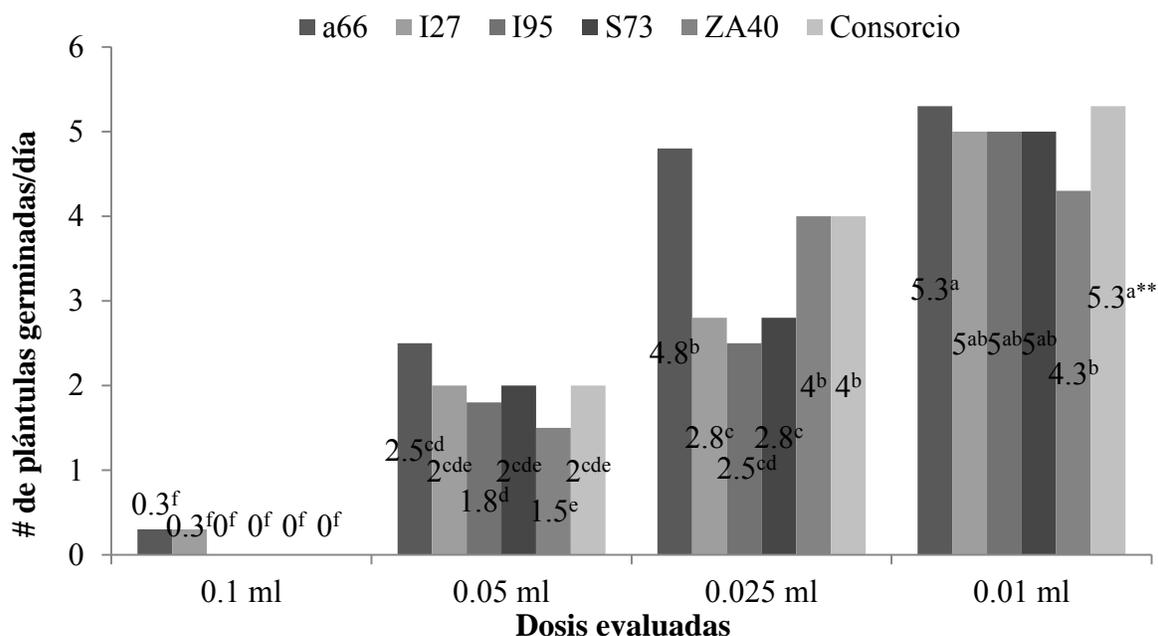


Figura 4.11. Efecto de la interacción cepa por dosis de inóculo en el índice de germinación a 14 después de la siembra. ** Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P < 0.01$).

Cassán *et al.* (2009), evaluaron el efecto de *A. brasilense* AZ39 y *Bradyrhizobium japonicum*, en inoculación sola y combinada para la promoción temprana de maíz y soya, observaron que la inoculación sola y combinada incrementó los porcentajes de germinación comparado con el testigo, tanto, a 5 y 8 dds en soya, lo mismo, ocurrió para maíz a 4 y 7 dds.

4.3.3. Efecto de la inoculación en rendimiento de biomasa

Capacidad de campo humedad aprovechable. Para conocer los valores de punto de marchitez permanente y capacidad de campo se realizó un estudio de estas variables al suelo que se utilizó (Cuadro 4.1) como sustrato en tubines cuyos valores fueron 10.1 y 16.4% de humedad, respectivamente y el rango de la humedad aprovechable vario de 50 a 75%.

Cuadro 4.1. Características físicas y químicas de suelo utilizado en experimento de plántulas.

| pH | MO | CE | CIC | N | P | K | N-NO3 | N-NH4 | T | A | L | Ar |
|------------------|------|--------------------|------------------------|------|----|-----|---------------------|-------|-----|----|---|----|
| H ₂ O | % | dS m ⁻¹ | meq 100g ⁻¹ | % | | | mg kg ⁻¹ | | | % | | |
| 7.9 | 12.3 | 0.39 | 19.9 | 0.61 | 70 | 1.9 | 33 | 7 | FAA | 66 | 4 | 30 |

T=textura; FAA=franco arcillo arenoso; A=arena; L=limo; Ar=Arcilla. El suelo usado fue de los terrenos de la Universidad Autónoma Chapingo.

4.3.3.1. altura de planta en pasto Banderita, inoculado con bacterias de vida libre

Se observaron diferencias significativas ($P<0.01$; Fig. 4.12) para las fechas 38, 52 y 80 dds, siendo el G1 2.7, 2.7 y 1.8 cm, respectivamente, mayor que G2 y, para 65 dds, no se observaron diferencias ($P>0.05$), con valores de 28.9 y 28.6 cm para G1 y G2, respectivamente.

Para dosis evaluadas, no se observaron diferencias ($P>0.05$), con valores de 11.2 y 11.1; 22.1 y 22.4; 28.9 y 28.6; 32.8 y 32 cm, para G1 y G2 a 38, 52, 65 y 80 dds, respectivamente. Se observaron diferencias significativas ($P<0.01$; Fig. 4.13) para muestreo, siendo C3 y C4 superiores a las cepas evaluadas y al testigo con 4.8 y 4.2 cm, respectivamente, a 38 dds. A 52 dds, los mayores promedios de altura de planta se observaron para C6 y C4, con 12.4 y 10.8 cm, respectivamente, mayor al observado en C7. A 65 dds, C6 presentó la mayor altura de planta con relación a todas las cepas evaluadas; por su parte, C7 superó a C1 y C2 con 4.5 y 2.7 cm, respectivamente. La mayor altura de planta ($P<0.01$) se observó para C6 y C4 con 7.1 y 3.9 cm, respectivamente, mayor que C7; por el contrario, C7 superó a C1 con 2.9 cm. Por su parte C1 y C2 no mostraron efecto, para altura de planta, a 80 dds.

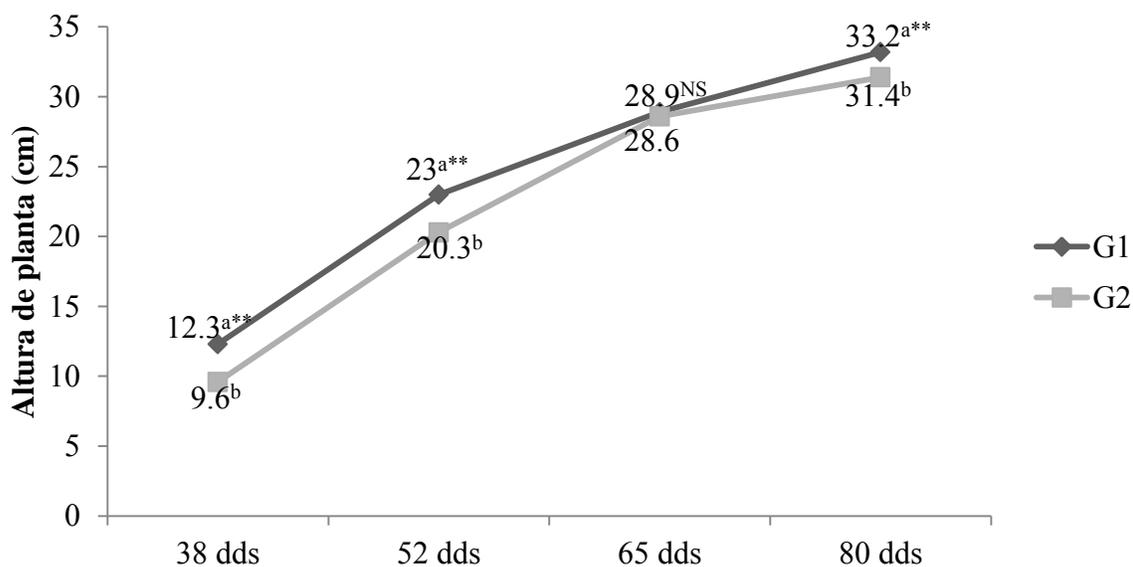


Figura 4.12. Altura de planta en los dos genotipos evaluados en las diferentes fechas de muestreo. Genotipos G1= La Zarca, G2=5. dds= días después de la siembra. ** Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P<0.01$).

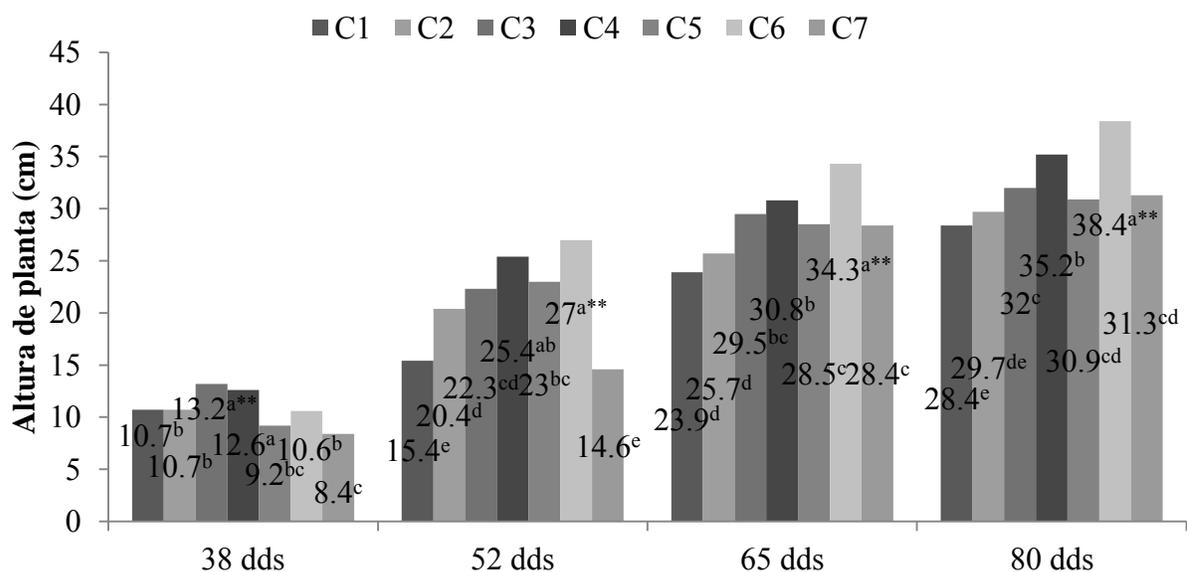


Figura 4.13. Altura de planta por cepa evaluada. C1=cepa a66; C2=cepa I27; C3=cepa I95; C4=cepa S73; C5=cepa ZA40; C6=consorcio; C7=testigo (sin inoculación). ** Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P<0.01$).

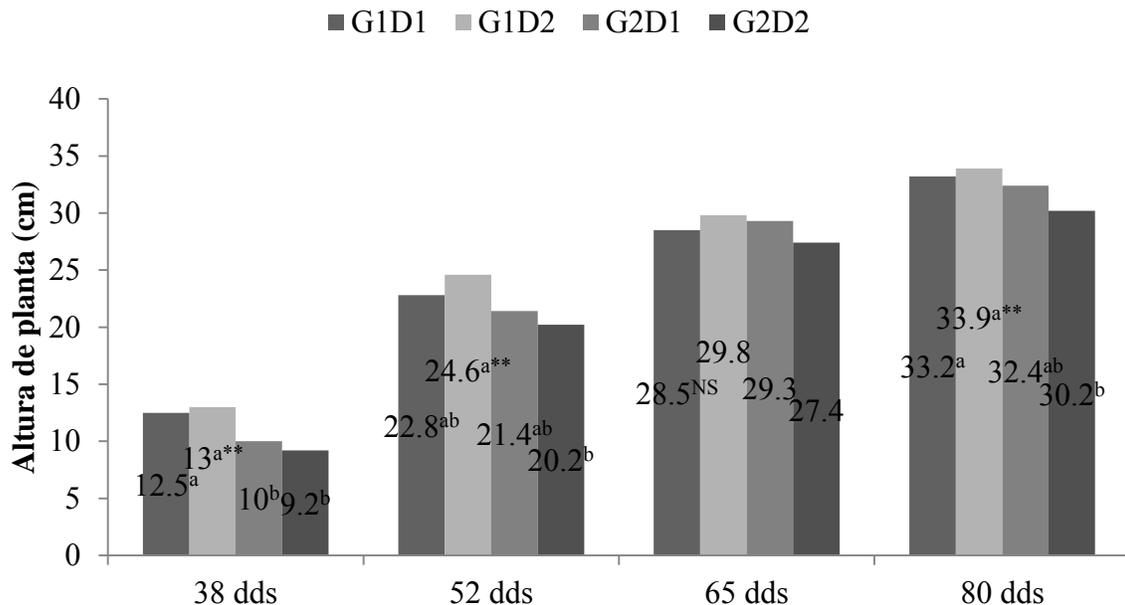


Figura 4.14. Efecto de la interacción genotipo por dosis de aplicación en altura de planta. G1=genotipo La Zarca; D1=inoculación de 0.5 ml; G2=genotipo 5; D2=inoculación de 1 ml. dds=días después de la siembra. ** Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P<0.01$).

Para interacción genotipo por dosis de inoculante en las fechas de muestreo, mostraron diferencias ($P<0.01$; Fig. 4.14) en los diferentes muestreos, siendo el G1D2 el que presentó mayores alturas, por el contrario G2D2 fue el que mostró los menores promedios de altura de planta. Lo anterior, indica que se debe determinar la dosis específica para cada genotipo; sin embargo, se observaron incrementos de tamaño desde el día 38 hasta el día 80 de 2.7, 2.6, 3.2 y 3.3 magnitudes para G1D1, G1D2, G2D1 y G2D2, respectivamente.

Los promedios de altura de planta en respuesta a la interacción genotipo por cepa evaluada, mostraron que G1C3 presentó mayor altura ($P<0.01$; Cuadro 4.2); mientras que G1C7 mostró la menor altura a 38 dds. Para los muestreos 52, 65 y 80 dds, G1C6 mostró los mayores promedios de altura de planta ($P<0.01$) comparado con las otras interacciones. Por tanto, se puede argumentar que la combinación de cepas (consorcio) incrementa la altura de planta en el G1 y G2. Por otro lado, tanto en el G1 como el G2 presentaron mayores alturas cuando no se inocularon, con relación, a la inoculación de la cepa a66 a los 65 y 80 dds.

Cuadro 4.2. Efecto de la interacción genotipo por cepa, en altura de la planta (cm), en las diferentes fechas de muestreo.

| Interacción | 38 dds | 52 dds | 65 dds | 80 dds |
|-------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Genotipo por cepa | | | | |
| G1C1 | 11.8 ^c | 15.2 ^e | 21.5 ^h | 29.0 ^{ef} |
| G1C2 | 11.3 ^{cde} | 23.0 ^c | 26.5 ^{fg} | 30.5 ^{de} |
| G1C3 | 17.5 ^{a**} | 26.8 ^b | 29.1 ^{de} | 30.0 ^{de} |
| G1C4 | 15.2 ^b | 27.9 ^b | 31.4 ^{bc} | 37.2 ^b |
| G1C5 | 9.9 ^{defg} | 18.4 ^d | 27.1 ^{ef} | 30.9 ^d |
| G1C6 | 10.9 ^{cdef} | 31.0 ^{a**} | 39.3 ^{a**} | 43.7 ^{a**} |
| G1C7 | 7.4 ⁱ | 14.6 ^e | 25.8 ^{fg} | 29.0 ^{ef} |
| G2C1 | 9.7 ^{fgh} | 15.7 ^e | 26.3 ^{fg} | 27.8 ^f |
| G2C2 | 10.1 ^{defg} | 17.8 ^d | 24.9 ^g | 28.8 ^{ef} |
| G2C3 | 9.0 ^{ghi} | 17.8 ^d | 29.8 ^{bcd} | 34.0 ^c |
| G2C4 | 10.0 ^{efg} | 23.0 ^c | 30.1 ^{bcd} | 33.1 ^c |
| G2C5 | 8.4 ^{hi} | 27.7 ^b | 29.9 ^{bcd} | 30.9 ^d |
| G2C6 | 10.4 ^{cdefg} | 22.9 ^c | 29.2 ^{cde} | 33.0 ^c |
| G2C7 | 9.5 ^{fgh} | 14.6 ^e | 31.0 ^{bcd} | 33.6 ^c |

G1=genotipo La Zarca; G2=genotipo 5; C1=cepa a66; C2=cepa I27; C3=cepa I95; C4=cepa S73; C5=cepa ZA40; C6=consorcio; C7=testigo (sin inoculación). dds=días después de la siembra. ** Literales diferentes dentro de columna indican diferencia significativa ($P<0.01$).

La interacción D2C3 presentó la mayor altura ($P<0.01$; Cuadro 4.3) con respecto a las cepas evaluadas a 38 dds; sin embargo, para los muestreos a 52, 65 y 80 dds, D1C6 y D2C6 fue la interacción que presentó los promedios superiores ($P<0.01$); por el contrario, D1C1 y D2C1 fueron las que obtuvieron las menores alturas desde 52 dds hasta 80 dds.

Para la interacción genotipo por cepa por dosis de inoculación, a 38 dds, la C3 tanto en la D1 como en D2 en G1, presentó los mayores promedios de altura de planta ($P<0.01$; Cuadro 4.4). Por otro lado, C1 con D2 en el G2, presentó la menor alturas de planta ($P<0.01$); mientras que, C6 con D2 en G2 obtuvo alturas de planta superiores a las demás cepas evaluadas. A 52 dds, la C6 presentó las mayores alturas ($P<0.01$) de planta tanto en la D1 como D2 del G1; por otro lado, la C5 en las D1 y D2 fueron en las que se obtuvieron alturas superiores ($P<0.01$) con relación a las otras cepas evaluadas, dentro del G2. Los mayores valores de altura de planta

($P<0.01$) a 65 dds fueron para C6 en las D1 y D2 en el G1 con relación a las demás cepas, por otra parte, los mayores promedios de altura fueron para C6 en la D1 del G2. Las alturas de plantas testigo de G1 como de G2 con valores de 25.8 y 31 cm, respectivamente, superaron la altura de la inoculación de C1. A 80 dds los valores superiores de altura ($P<0.01$) se observaron en C6 con las D1 y D2 en el G1; por otro lado, la C6 con la D1 en el G2 mostró mayor altura de planta con respecto a las demás cepas; mientras que, la C3 en la D2 fue la que presentó la mayor altura comparada con las otras cepas, en el G2. El testigo fue superior a las C1 y C2, cuyo valor fue de 33.6 cm. Cabe mencionar que en todos los muestreos en C6, la D2 fue superior en altura de planta a la D1 del G1; por el contrario, en los muestreos a 52, 65 y 80 dds, la D1 presentó las mayores alturas con relación a la D2 en el G2. Lo anterior, es importante, cuando se pretende obtener plántulas con mayor capacidad de competencia durante los primeros días de desarrollo de la pradera.

Cuadro 4.3. Efecto de la interacción dosis de inoculación por cepa evaluada, para altura de planta (cm), en las diferentes fechas de muestreo.

| Interacción | 38 dds | 52 dds | 65 dds | 80 dds |
|----------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Dosis por cepa | | | | |
| D1C1 | 11.4 ^d | 15.1 ^e | 23.5 ^f | 28.5 ^{gh} |
| D1C2 | 12.6 ^{bc} | 18.5 ^d | 25.2 ^{ef} | 30.0 ^{efg} |
| D1C3 | 12.6 ^{bc} | 22.8 ^{bc} | 30.1 ^{cd} | 32.5 ^d |
| D1C4 | 12.0 ^{cd} | 25.9 ^a | 30.7 ^c | 36.2 ^b |
| D1C5 | 9.0 ^f | 23.6 ^b | 28.5 ^d | 30.8 ^{ef} |
| D1C6 | 9.7 ^e | 27.0 ^{a**} | 35.5 ^{a**} | 38.8 ^{a**} |
| D2C1 | 10.0 ^e | 15.8 ^e | 24.3 ^{ef} | 28.3 ^h |
| D2C2 | 8.7 ^f | 22.3 ^{bc} | 26.2 ^e | 29.3 ^{fgh} |
| D2C3 | 13.9 ^{a**} | 21.8 ^c | 28.8 ^{cd} | 31.5 ^{de} |
| D2C4 | 13.1 ^{ab} | 25.0 ^{ab} | 30.8 ^c | 34.1 ^c |
| D2C5 | 9.4 ^{ef} | 22.5 ^{bc} | 28.5 ^d | 31.0 ^{de} |
| D2C6 | 11.6 ^d | 26.9 ^a | 33.0 ^b | 37.9 ^a |

D1=dosis 0.5 ml de inóculo; D2=dosis 1 ml de inóculo; C1=cepa a66; C2=cepa I27; C3=cepa I95; C4=cepa S73; C5=cepa ZA40; C6=consorcio. dds=días después de la siembra. NS no significativo, * y ** Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P<0.05$) y ($P<0.01$), respectivamente.

Cuadro 4.4. Interacción genotipo por cepa por dosis de inoculación sobre altura de planta (cm), en las diferentes fechas de muestreo.

| 38 dds | | | | | 52 dds | | | | |
|--------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| C | G1 | | G2 | | C | G1 | | G2 | |
| | D1 | D2 | D1 | D2 | | D1 | D2 | D1 | D2 |
| C1 | 10.5 ^{cB} | 13.0 ^{cA} | 12.3 ^{a**A} | 7.0 ^{cC} | C1 | 13.2 ^{cB} | 17.1 ^{cA} | 17.0 ^{cA} | 14.4 ^{dB} |
| C2 | 14.0 ^{bA} | 8.5 ^{cC} | 11.3 ^{abB} | 8.9 ^{bC} | C2 | 20.0 ^{cB} | 26.0 ^{bA} | 17.0 ^{cC} | 18.6 ^{cB} |
| C3 | 17.0 ^{a**A} | 18.0 ^{a**A} | 8.3 ^{dC} | 9.7 ^{abB} | C3 | 27.5 ^{bA} | 26.0 ^{bA} | 18.0 ^{cB} | 17.5 ^{cB} |
| C4 | 14.3 ^{bB} | 16.0 ^{bA} | 9.8 ^{cC} | 10.2 ^{aC} | C4 | 28.5 ^{abA} | 27.2 ^{bA} | 23.2 ^{bB} | 22.8 ^{bB} |
| C5 | 9.8 ^{cdA} | 10.0 ^{dA} | 8.1 ^{dB} | 8.7 ^{dB} | C5 | 17.8 ^{dC} | 19.0 ^{cC} | 29.3 ^{a**A} | 26.0 ^{a**B} |
| C6 | 9.3 ^{dC} | 12.5 ^{cA} | 10.1 ^{bcBC} | 10.7 ^{a**B} | C6 | 30.0 ^{a**A} | 32.0 ^{a**A} | 24.0 ^{bB} | 21.8 ^{bC} |

| 65 dds | | | | | 80 dds | | | | |
|--------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| C | G1 | | G2 | | C | G1 | | G2 | |
| | D1 | D2 | D1 | D2 | | D1 | D2 | D1 | D2 |
| C1 | 21.0 ^{dB} | 22.0 ^{dB} | 26.0 ^{bA} | 26.6 ^{bcdA} | C1 | 29.0 ^{cNS} | 29.0 ^d | 28.0 ^c | 27.6 ^d |
| C2 | 25.0 ^{cB} | 28.0 ^{cA} | 25.4 ^{bA} | 24.3 ^{dB} | C2 | 31.0 ^{cA} | 30.0 ^{cdA} | 29.0 ^{cA} | 28.6 ^{cdB} |
| C3 | 29.2 ^{bNS} | 29.0 ^{bc} | 31.0 ^a | 28.6 ^{abc} | C3 | 30.0 ^{cB} | 30.0 ^{cdB} | 35.0 ^{aA} | 33.0 ^{a**A} |
| C4 | 31.0 ^{bNS} | 31.8 ^b | 30.4 ^a | 29.8 ^{a**} | C4 | 37.4 ^{bA} | 37.0 ^{bA} | 35.0 ^{aB} | 31.2 ^{abC} |
| C5 | 26.2 ^{cB} | 28.0 ^{cA} | 30.8 ^{aA} | 29.0 ^{abA} | C5 | 30.4 ^{cNS} | 31.4 ^c | 31.2 ^b | 30.6 ^{bc} |
| C6 | 38.6 ^{a**A} | 40.0 ^{a**A} | 32.4 ^{a**B} | 26.0 ^{cdC} | C6 | 41.6 ^{a**B} | 45.8 ^{a**A} | 36.0 ^{a**C} | 30.0 ^{bcD} |

G1=genotipo La Zarca; G2=genotipo 5; D1=dosis 0.5 ml de inóculo; D2=dosis 1 ml de inóculo; C1=cepa a66; C2=cepa I27; C3=cepa I95; C4=cepa S73; C5=cepa ZA40; C6=consorcio. dds=días después de la siembra. NS no significativo, ** Literales diferentes minúsculas indican diferencia significativa dentro de columnas y literales mayúsculas dentro de fila indican diferencia significativa ($P<0.01$).

Es importante señalar que la inoculación con C3, C4 y C6 resultaron en mayor altura de planta con relación al testigo en las diferentes fechas de muestreo; por tanto, la inoculación de estas bacterias promotoras del crecimiento vegetal puede ser una alternativa para incrementar la altura de forraje en los genotipos evaluados. Diversos autores señalan la importancia de la inoculación con bacterias benéficas para incrementar la altura de planta, tal es el caso de Ilyas y Bano (2010), que estudiaron la inoculación de cepas de *Azospirillum* en trigo y obtuvieron 7 y 5.5 cm de mayor altura en plantas con cepas de *Azospirillum* aisladas de terrenos de riego y

terrenos áridos, respectivamente; sin embargo, con la aplicación de riego en el mismo estudio, se encontró que plantas inoculadas y con estrés hídrico fueron 7.7 y 9.5 cm más altas en terrenos de riego y terrenos áridos, respectivamente con relación al testigo, el cual no se inoculó y estuvo expuesto a estrés hídrico durante 7 d.

Terry *et al.* (2005), encontraron que los géneros de *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* y *Streptomyces*, forman parte de la diversidad microbiana de la rizosfera de tomate y que *Azospirillum*, es el género dominante. La inoculación artificial de esta rizobacteria incrementó el crecimiento de las plántulas, así como, la nutrición de las mismas, esto contribuyó a que aumentara el rendimiento agrícola en 11%.

Pains *et al.* (2008), evaluaron el efecto de inoculación con 12 cepas de *A. amazonense* en el crecimiento, rendimiento y fijación de Nitrógeno en arroz y observaron que 50% de las cepas que utilizaron tuvieron valores inferiores de altura de planta; además, para longitud de la raíz, 40% de las cepas presentaron, a 30 dds, valores menores con relación al testigo. Cassán *et al.* (2009), evaluaron el efecto de *A. brasilense* y *Bradyrhizobium japonicum*, en la inoculación sola y combinada en soya y maíz a 8 dds, encontraron incrementos significativos con la inoculación tanto sola como combinada con relación a testigo para longitud de hipocotilo y longitud radical en soya; para maíz, la inoculación incrementó la longitud de coleóptilo y la radícula; sin embargo, los mayores valores se observaron con *A. brasilense*, comparado con la inoculación combinada. Felici *et al.* (2008), estudiaron el efecto de inoculación sola y combinada de *Bacillus subtilis* y *A. brasilense* en tomate, observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) para longitud de planta a 45 dds en donde la inoculación sola de *B. subtilis* y *A. brasilense* presentaron las mayores valores (38 cm), comparada con el testigo, cuyo valor fue de 31 cm y para la combinación de bacterias, fue de 33 cm.

4.3.3.2. rendimiento de biomasa de pasto Banderita

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.01$; Fig. 4.15) entre genotipos para las diferentes fechas, siendo el G1 superior al G2 en 4.7, 33.1, 45.5 y 53.4 mg planta⁻¹ a 38, 52, 65 y 80 dds, respectivamente.

Se observaron diferencias significativas ($P < 0.01$) a 38, 52 y 65 dds para PSA, D2 superó en 5.8 y 2.2 mg planta⁻¹ a D1, con promedios de 20.4 y 57.2 mg planta⁻¹ a 38 y 52 dds, respectivamente; por el contrario, a 65 dds la D1 fue superior a la D2 en 4.2 mg planta⁻¹, con

valor de 129.2 mg planta⁻¹. Por otra parte, a 80 dds no se encontraron diferencias ($P>0.05$) entre dosis de inoculación, (206.6 y 208.4 mg planta⁻¹ para la D1 y D2, respectivamente).

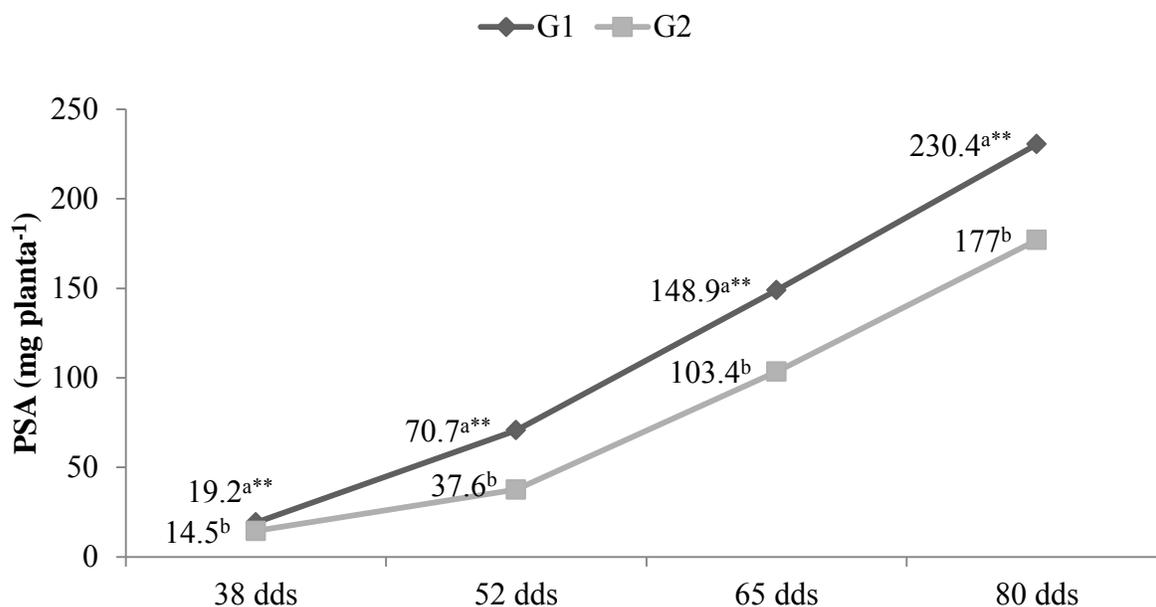


Figura 4.15. Peso seco de la parte aérea (PSA) de los dos genotipos y por fecha de muestreo. G1=genotipo La Zarca; G2=genotipo 5. dds=días después de la siembra. ** Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P<0.01$).

Los mayores PSA ($P<0.01$; Cuadro 4.5) se obtuvieron en C3 a 38 y 52 dds; sin embargo, a 65 y 80 dds, los mayores promedios de peso seco se encontraron en C6; por el contrario, pesos inferiores al testigo se observaron en C5 a 38 y 65 dds. Ésto nos indica que C2, C3, C4 y C6 son cepas que pueden utilizarse como opciones para incrementar el rendimiento de materia seca de los genotipos evaluados y/o al apoyo en el desarrollo inicial vigoroso de plántulas de esta especie, que normalmente encuentra amplia competencia en el ambiente.

Similarmente, se observaron diferencias significativas ($P<0.01$; Fig. 4.16) dentro de fechas de muestreo, siendo G1D2 la que presentó los mayores rendimientos, seguido de G2D2 a los 38 dds. Para 52, 65 y 80 dds, los mayores promedios se observaron para G1D2, seguido de G1D1; por el contrario, los menores rendimientos en esta misma fecha de muestreo, correspondieron a G2D2. Esta misma tendencia presentó altura de planta (Figura 4.14); sin embargo, en peso seco la tendencia es marcada y G2D2 presentó los menores valores.

Cuadro 4.5. Producción de peso seco de la parte aérea, en genotipos evaluados, como respuesta a la cepa utilizada.

| Cepa | 38 dds | | 52 dds | | 65 dds | | 80 dds | |
|------|-------------------------|-------|-------------------------|-------|-------------------------|-------|-------------------------|-------|
| | mg planta ⁻¹ | Inc % |
| C1 | 15.5 ^c | 68.5 | 39.4 ^c | 28.8 | 106.3 ^d | -7.8 | 189.4 ^e | 19.4 |
| C2 | 15.5 ^c | 68.5 | 56.1 ^c | 83.3 | 137.7 ^b | 19.4 | 216.0 ^c | 36.2 |
| C3 | 32.5 ^{a**} | 253.3 | 77.9 ^{a**} | 154.6 | 138.9 ^b | 20.5 | 209.2 ^d | 31.9 |
| C4 | 18.5 ^b | 100.1 | 64.6 ^b | 111.1 | 116.0 ^c | 0.6 | 232.5 ^b | 46.6 |
| C5 | 8.8 ^d | -4.3 | 42.3 ^d | 38.2 | 114.4 ^c | -8.8 | 160.0 ^f | 0.9 |
| C6 | 14.4 ^c | 56.5 | 56.4 ^c | 84.3 | 149.2 ^{a**} | 29.4 | 237.7 ^{a**} | 49.9 |
| C7 | 9.2 ^d | --- | 30.6 ^f | --- | 115.3 ^c | --- | 158.6 ^f | --- |

Peso seco de parte aérea (PSA) por cepa evaluada. C1=cepa a66; C2=cepa I27; C3=cepa I95; C4=cepa S73; C5=cepa ZA40; C6=consorcio; C7=testigo (sin inoculación). Inc=incremento. NS no significativo, ** Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P<0.01$).

A 38 dds, para PSA, G1C3 presentó los mayores rendimientos de forraje ($P<0.01$; Cuadro 4.6); por el contrario, los menores rendimiento se observaron en G2C7. Así mismo, a 52 y 65 dds, los mayores rendimientos ($P<0.01$) se observaron para G1C3, y los menores valores, en G2C2. A 80 dds, los mayores rendimientos ($P<0.01$), se observaron en G1C2, y los menores, en G2C5 y G2C7. El genotipo influyó la eficiencia de asociación con las bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Los mayores rendimientos de forraje ($P<0.01$; Cuadro 4.7), se obtuvieron en D2C3 y D1C3 y los menores promedios se reportaron para D2C5 y D1C5 a 38 dds. A 52 dds, los mayores rendimientos ($P<0.01$) se obtuvieron D2C3 y D1C3 y, los menores, para D1C1 y D2C5. Los mayores rendimientos de forraje ($P<0.01$) a 65 y 80 dds correspondieron a D1C6. La utilización de consorcios en la inoculación de pastos puede ser una alternativa para incrementar los rendimientos de forraje; sin embargo, es necesario, realizar más estudios en campo.

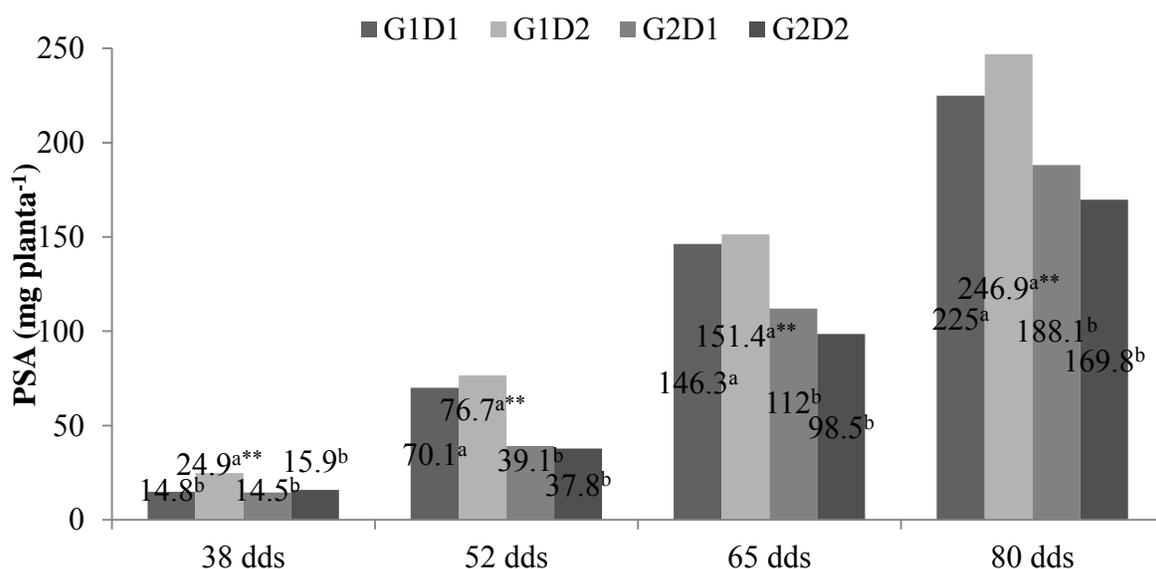


Figura 4.16. Efecto de la interacción genotipo por dosis de aplicación sobre peso seco de la parte aérea (PSA). G1=genotipo La Zarca; D1=inoculación de 0.5 ml; G2=genotipo 5; D2=inoculación de 1 ml. dds=días después de la siembra. ** Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P<0.01$).

Para la interacción genotipo por cepa por dosis de inoculación, los mayores valores ($P<0.01$; Cuadro 4.8) de PSA, se observaron en C3 (tanto D1 como D2), para G1. Se obtuvieron promedios superiores de PSA en C7 con G1 (11.8 mg planta⁻¹), superior a C5 y C6 en D1 y, C2 y C5 en D2. Para G2 la C4 con D1 presentó los promedios mayores de PSA ($P<0.01$) con respecto a las otras cepas; así mismo, en el G2 la C6 con D2 obtuvo valores superiores de PSA ($P<0.01$) con relación a todas las cepas, sin embargo, en G2C7 presentó mayor PSA ($P<0.01$) con 6.6 mg/planta con respecto a C5, todo lo anterior fue a 38 dds. A 52 dds, se encontraron los mayores promedios de PSA ($P<0.01$) en G1 con C3 en D1 y D2 comparado con las demás cepas evaluadas y el menor PSA se obtuvo en G1C1D1, incluso menor al testigo cuyo valor fue de 33.5 mg planta⁻¹; por otra parte, en G2 los mayores promedios de PSA se observaron en C4 con D1 y C6 con D2; contrariamente, los menores PSA se encontraron en C2 tanto en D1 como D2, valores inferiores al testigo (27.7 mg planta⁻¹). A 65 dds, los mayores promedios de PSA ($P<0.01$) se observaron con G1C6D1 y, para la D2, los mayores valores ($P<0.01$) correspondieron para C2. A 80 dds, los mayores promedios ($P<0.01$) de PSA los presentaron

G1C4D1 y G1C2D2 y los menores valores se obtuvieron en G1C1D1 incluso éste fue inferior al testigo (164.2 mg planta⁻¹) y G1C5D2. En G2 los mayores valores ($P<0.01$) fueron para C6D1 y C4D2 y los menores promedios correspondieron a C5D1 y C2D2, este último y C5D2 fueron inferiores al testigo (153.0 mg planta⁻¹).

Cuadro 4.6. Efecto de la interacción genotipo por cepa evaluada sobre el peso seco aéreo (mg planta⁻¹), en los diferentes muestreos.

| Interacción genotipo por cepa | 38 dds | 52 dds | 65 dds | 80 dds |
|-------------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| G1C1 | 21.7 ^{bc} | 44.8 ^f | 113.1 ^d | 188.9 ^e |
| G1C2 | 12.9 ^{def} | 87.0 ^b | 175.1 ^a | 276.0 ^{a**} |
| G1C3 | 49.5 ^{a**} | 118.1 ^{a**} | 178.3 ^{a**} | 253.4 ^c |
| G1C4 | 16.7 ^{cde} | 76.7 ^c | 108.8 ^{de} | 269.8 ^{ab} |
| G1C5 | 9.0 ^f | 50.7 ^{ef} | 146.3 ^b | 167.5 ^f |
| G1C6 | 9.3 ^f | 65.6 ^d | 171.5 ^a | 260.3 ^{bc} |
| G1C7 | 11.8 ^{ef} | 33.5 ^{gh} | 149.5 ^b | 164.2 ^{fg} |
| G2C1 | 9.2 ^f | 34.1 ^{gh} | 99.5 ^e | 165.1 ^e |
| G2C2 | 18.1 ^{cde} | 25.2 ⁱ | 100.2 ^e | 156.0 ^{fg} |
| G2C3 | 15.4 ^{de} | 37.7 ^g | 99.5 ^e | 165.1 ^{fg} |
| G2C4 | 20.3 ^{bcd} | 52.6 ^e | 123.3 ^{cd} | 195.2 ^e |
| G2C5 | 8.5 ^f | 34.0 ^{gh} | 82.4 ^f | 152.5 ^g |
| G2C6 | 19.5 ^{bcd} | 47.2 ^{ef} | 126.8 ^c | 215.0 ^d |
| G2C7 | 6.5 ^f | 27.7 ^{hi} | 81.2 ^f | 153.0 ^{fg} |

G1=genotipo La Zarca; G2=genotipo 5; C1=cepa a66; C2=cepa I27; C3=cepa I95; C4=cepa S73; C5=cepa ZA40; C6=consorcio; C7=testigo (sin inoculación). dds=días después de la siembra. ** Literales diferentes dentro de columna indican diferencia significativa ($P<0.01$).

Peso seco de raíz (PSR), G1 fue diferente ($P<0.05$; Fig. 4.17) respecto al G2 en las diferentes fechas de muestreo con valores de 1.7, 11.8, 6 y 8.8 mg planta⁻¹ a 38, 52, 65 y 80 dds, respectivamente. Tanto en altura de planta como PSA y PSR, el G1 fue superior a G2 en las fechas de muestreo indicativo de mejor asociación entre las cepas evaluadas y G1.

Cuadro 4.7. Rendimiento de peso seco aéreo (mg planta^{-1}) con la interacción dosis de inoculación por cepa evaluada, en las diferentes fechas de muestreo.

| Interacción dosis por cepa | 38 dds | 52 dds | 65 dds | 80 dds |
|----------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| D1C1 | 11.9 ^f | 34.0 ^h | 89.9 ^h | 183.6 ^h |
| D1C2 | 15.3 ^e | 56.1 ^e | 135.6 ^c | 209.8 ^e |
| D1C3 | 23.2 ^b | 74.3 ^b | 139.6 ^b | 217.8 ^d |
| D1C4 | 16.3 ^e | 68.2 ^c | 125.2 ^e | 226.2 ^c |
| D1C5 | 10.4 ^g | 40.6 ^g | 115.3 ^f | 159.8 ⁱ |
| D1C6 | 10.7 ^{fg} | 56.9 ^e | 169.4 ^{a**} | 242.3 ^{a**} |
| D2C1 | 19.0 ^d | 44.9 ^f | 122.7 ^e | 195.3 ^g |
| D2C2 | 15.7 ^e | 56.1 ^e | 139.7 ^b | 222.2 ^c |
| D2C3 | 41.7 ^{a**} | 81.5 ^{a**} | 138.2 ^{bc} | 200.7 ^f |
| D2C4 | 20.6 ^c | 61.1 ^d | 106.9 ^g | 238.8 ^a |
| D2C5 | 7.2 ^h | 44.0 ^f | 113.4 ^f | 160.2 ⁱ |
| D2C6 | 18.1 ^d | 55.9 ^e | 128.9 ^d | 233.0 ^b |

D1=dosis 0.5 ml de inóculo; D2=dosis 1 ml de inóculo; C1=cepa a66; C2=cepa I27; C3=cepa I95; C4=cepa S73; C5=cepa ZA40; C6=consorcio. dds=días después de la siembra. ** Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P<0.01$).

Para el efecto de la dosis de inoculación, se observaron diferencias significativas para PSR ($P<0.01$; Fig. 4.18), siendo la D2 superior a la D1 en las fechas de muestreo con valores de 2.3, 2, 6.7 y 12.3 mg planta^{-1} a 38, 52, 65 y 80 dds, respectivamente. Al incrementar la dosis de inoculación aumentó el PSR. Las cepas evaluadas contribuyeron al rendimiento de forraje y pueden ser una alternativa para apoyar el establecimiento de plántulas e incrementar la producción de materia seca en regiones áridas y semiáridas de México. Para las cepas evaluadas se observó incremento en cantidad de pelos radiculares.

Para PSR se observaron diferencias significativas dentro de muestreo ($P<0.01$; Cuadro 4.9) obteniendo el mayor PSR, la C3 comparada con las demás cepas, tanto a 38 como a 52 dds; además, en estos muestreos las cepas mostraron mayor incremento en PSR con relación a C7. A 65 dds, de igual forma, C3 presentó los mayores promedios ($P<0.01$) de PSR comparada con las demás cepas. Sin embargo, C7 superó a C1 y C2 con valores de 6.6 y 1.3 mg planta^{-1} , respectivamente. A 80 dds los mayores promedios de PSR ($P<0.01$) fueron para C6 y C2, C3

y C4, respectivamente y diferentes entre cepas; sin embargo, C1 y C5 fueron igual a C7 ($P>0.05$).

Cuadro 4.8. Efecto de la interacción genotipo por cepa evaluada por dosis de inoculación sobre el rendimiento de forraje de la parte aérea (mg planta^{-1}).

| 38 dds | | | | | 52 dds | | | | |
|--------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| G1 | | G2 | | | G1 | | G2 | | |
| C | D1 | D2 | D1 | D2 | C | D1 | D2 | D1 | D2 |
| C1 | 12.8 ^{cb} | 30.7 ^{ba} | 11.0 ^{cb} | 7.4 ^{dc} | C1 | 29.7 ^{ec} | 60.0 ^{da} | 38.4 ^{cb} | 29.7 ^{ec} |
| C2 | 16.3 ^{bb} | 9.4 ^{dd} | 14.2 ^{bc} | 21.9 ^{ba} | C2 | 88.6 ^{ba} | 85.4 ^{bb} | 23.5 ^{fd} | 26.8 ^{fc} |
| C3 | 31.3 ^{a**B} | 67.7 ^{a**A} | 15.2 ^{bc} | 15.6 ^{cc} | C3 | 118.5 ^{a**A} | 117.6 ^{a**A} | 30.0 ^{ec} | 45.3 ^{bb} |
| C4 | 13.3 ^{cc} | 20.0 ^{cab} | 19.3 ^{a**B} | 21.2 ^{ba} | C4 | 72.8 ^{cb} | 80.6 ^{ca} | 63.6 ^{a**C} | 41.5 ^{cd} |
| C5 | 8.4 ^{db} | 9.7 ^{db} | 12.3 ^{ca} | 4.8 ^{cc} | C5 | 45.5 ^{db} | 55.6 ^{ea} | 35.8 ^{dc} | 32.2 ^{dd} |
| C6 | 6.6 ^{dd} | 12.0 ^{dc} | 14.7 ^{bb} | 24.2 ^{a**A} | C6 | 70.6 ^{ca} | 60.6 ^{db} | 43.1 ^{bd} | 51.2 ^{a**C} |

| 65 dds | | | | | 80 dds | | | | |
|--------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| G1 | | G2 | | | G1 | | G2 | | |
| C | D1 | D2 | D1 | D2 | C | D1 | D2 | D1 | D2 |
| C1 | 95.8 ^{fc} | 130.4 ^{da} | 84.0 ^{dd} | 115.0 ^{a**B} | C1 | 162.2 ^{dd} | 215.5 ^{da} | 205.0 ^{bb} | 175.0 ^{cc} |
| C2 | 170.0 ^{cb} | 180.2 ^{a**A} | 101.2 ^{cc} | 99.2 ^{bc} | C2 | 257.0 ^{bb} | 295.0 ^{a**A} | 162.6 ^{ec} | 149.4 ^{dd} |
| C3 | 178.3 ^{ba} | 178.2 ^{aA} | 100.8 ^{cb} | 98.2 ^{bb} | C3 | 260.4 ^{aba} | 246.3 ^{cb} | 175.2 ^{dc} | 155.0 ^{dd} |
| C4 | 105.1 ^{ec} | 112.4 ^{eb} | 145.2 ^{ba} | 101.4 ^{bc} | C4 | 264.8 ^{a**B} | 274.8 ^{ba} | 187.6 ^{cd} | 202.8 ^{a**C} |
| C5 | 145.6 ^{da} | 147.0 ^{ca} | 85.0 ^{db} | 79.8 ^{cc} | C5 | 165.8 ^{da} | 169.2 ^{ea} | 153.8 ^{fb} | 151.2 ^{db} |
| C6 | 182.8 ^{a**A} | 160.2 ^{bb} | 156.0 ^{a**C} | 97.6 ^{bd} | C6 | 240.0 ^{cb} | 280.6 ^{ba} | 244.6 ^{a**B} | 185.4 ^{bc} |

G1=genotipo La Zarca; G2=genotipo 5; D1=dosis 0.5 ml de inóculo; D2=dosis 1 ml de inóculo; C1=cepa a66; C2=cepa I27; C3=cepa I95; C4=cepa S73; C5=cepa ZA40; C6=consorcio. dds=días después de la siembra. ** Literales diferentes minúsculas indican diferencia significativa dentro de columnas y literales mayúsculas dentro de fila indican diferencia significativa ($P<0.01$).

Para la interacción genotipo por dosis de inoculación, los mayores promedios de PSR ($P<0.01$; Fig. 4.19) se obtuvieron en G1D2, seguido de G2D2 en todos los muestreos destructivos; por el contrario, los menores valores correspondieron a G2D1. Lo anterior, indica que para G2 es necesario realizar estudios en donde se inocule con cantidades mayores a las utilizadas para

determinar la dosis adecuada. Similarmente, es importante evaluar en condiciones de campo, para determinar la competitividad de las bacterias.

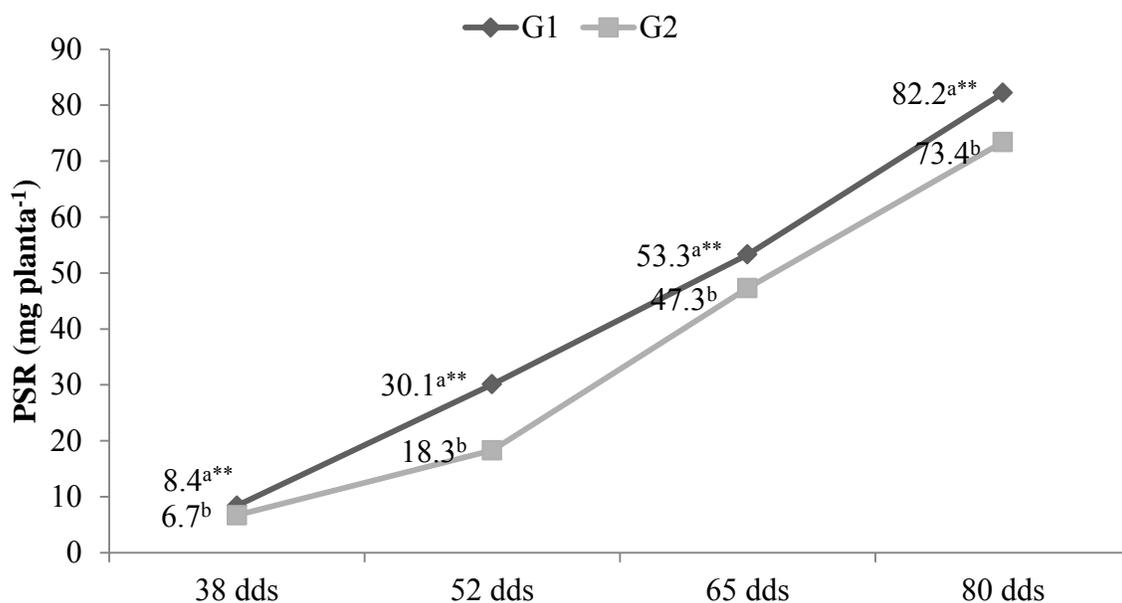


Figura 4.17. Peso seco de raíz (PSR) de dos genotipos evaluados por fecha de muestreo. G1=genotipo La Zarca; G2=genotipo 5. dds=días después de la siembra. ** Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P<0.01$).

Los mayores promedios de PSR se observaron en G1C3 ($P<0.01$; Cuadro 4.10) y los menores valores correspondieron a G1C6, a 38 dds; para G2, los mayores valores se observaron para C4 y los menores para C7, el cual fue inferior a las cepas evaluadas. A 52 dds, los mayores valores correspondieron a G1C3 ($P<0.01$) respecto a las cepas evaluadas y, en G1, todas las cepas fueron superiores a C7; por otro lado, G1C7 fue superior a G2C7 a 38 y 52 dds; sin embargo, a 65 y 80 dds los valores de G2C7 para PSR fueron mayores a G1C7.

Para la interacción dosis de inoculación por cepa evaluada en los muestreos destructivos sobre PSR, mostró que los mayores promedios de PSR se obtuvieron en D2C3 ($P<0.01$; Cuadro 4.11) y los menores valores correspondieron a D1C5 a los 38 y 52 dds.

La interacción genotipo por cepa evaluada por dosis de inoculación en muestreos destructivos para PSR, mostró que G1C3D1 fue diferente ($P<0.01$; Cuadro 4.12) a todas las cepas; por el

contrario G1C6D1, presentó los menores valores de PSR, incluso el testigo en G1 fue superior (4.1 mg planta⁻¹). A 52 dds los mayores valores ($P<0.01$) de PSR fueron para G1C3D1 y G1C3D2 y los menores promedios correspondieron a G1C5D1, valores similares al testigo. A 65 dds los mayores promedios ($P<0.01$) correspondieron para G1C3D1 y G1C3D2 y los menores valores fueron para G1C1D1 y las interacciones que presentaron promedios inferiores al testigo fueron G1C1D1 y G1C5D1; por otro lado, para D2 todas las interacciones fueron superiores al testigo. A 80 dds, los mayores promedios de PSR ($P<0.01$) se observaron para G1C2D2 y G1C3D1 y los menores correspondieron a G1C5D1 y G1C5D2, en este genotipo todas las interacciones fueron superiores al testigo.

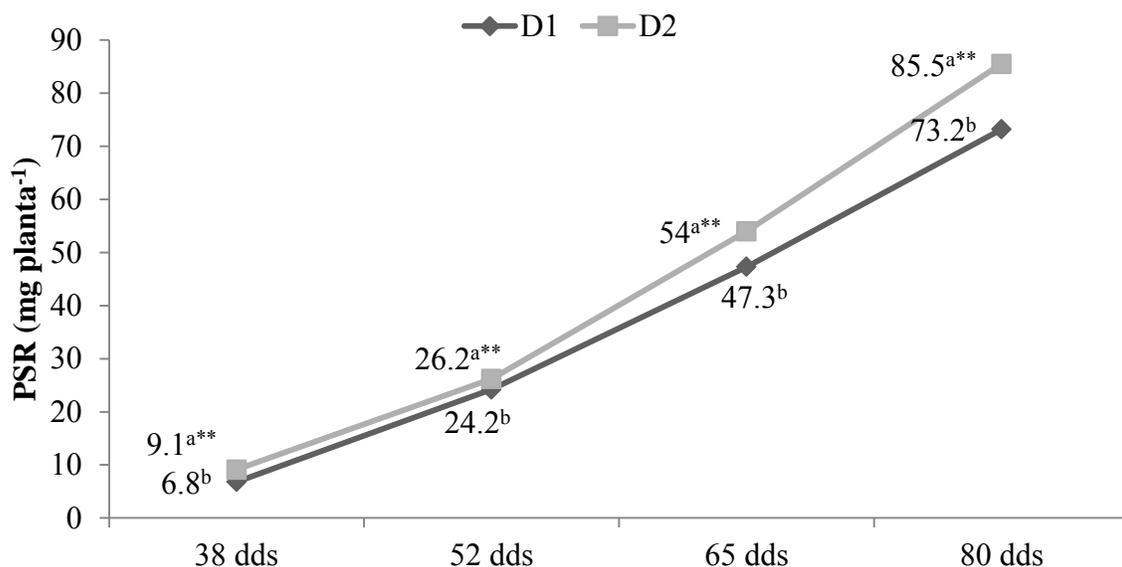


Figura 4.18. Peso seco de raíz (PSR) de las dosis de inoculación evaluadas por fechas de muestreo. D1=dosis de 0.5 ml de inoculación; D2=dosis de 1 ml de inoculación tubin⁻¹. dds=días después de la siembra. NS no significativo, ** Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P<0.01$).

Las cepas C2, C3, C4 y C6 evaluadas en el presente estudio demostraron ser una opción para incrementar el rendimiento de forraje comparado con el testigo, por tal motivo, es recomendable seguir realizando estudio con estas cepas en condiciones de campo. Fischer *et al.* (2007), evaluaron el efecto de cepas promotoras del crecimiento vegetal aisladas de raíz de

trigo y encontraron incrementos de peso seco de la parte aérea que variaron de 16 a 25%, también, obtuvieron aumento de peso seco de raíz de 45%, comparado con el testigo.

Cuadro 4.9. Peso seco de la raíz en las diferentes cepas evaluadas y diversas fechas de muestreos destructivos.

| Cepa | 38 dds | Inc | 52 dds | Inc | 65 dds | Inc | 80 dds | Inc |
|------|-------------------------|-------|-------------------------|-------|-------------------------|-------|-------------------------|-------|
| | mg planta ⁻¹ | % |
| C1 | 11.1 ^b | 326.9 | 20.6 ^c | 71.7 | 39.5 ^e | -14.3 | 61.0 ^d | 3.2 |
| C2 | 5.1 ^d | 96.2 | 21.1 ^c | 75.8 | 44.8 ^d | -2.8 | 95.0 ^a | 60.7 |
| C3 | 14.7 ^{a**} | 465.4 | 39.8 ^{a**} | 231.7 | 69.0 ^{a**} | 49.7 | 89.0 ^b | 50.6 |
| C4 | 8.1 ^c | 211.5 | 31.4 ^b | 161.7 | 46.2 ^{cd} | 0.2 | 73.2 ^c | 23.9 |
| C5 | 3.3 ^e | 26.9 | 16.1 ^d | 34.2 | 48.9 ^c | 6.1 | 61.3 ^d | 3.7 |
| C6 | 5.4 ^d | 107.7 | 22.2 ^c | 85.0 | 55.5 ^b | 20.4 | 96.8 ^{a**} | 63.8 |
| C7 | 2.6 ^f | ----- | 12.0 ^e | ----- | 46.1 ^{cd} | ----- | 59.1 ^d | ----- |

Peso seco de raíz (PSR) por cepa evaluada. C1=cepa a66; C2=cepa I27; C3=cepa I95; C4=cepa S73; C5=cepa ZA40; C6=consorcio; C7=testigo (sin inoculación). Inc=incremento. ** Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P<0.01$).

Ilyas y Bano (2010), observaron que la inoculación con cepas de *Azospirillum* incrementa el peso seco de la parte aérea de la planta tanto comparado cuando no se inocula; además, encontraron que se incrementa el peso seco de la parte aérea cuando la planta no tiene estrés hídrico con respecto a los tratamientos en donde se les aplicó el estrés hídrico, por el contrario, los mayores pesos secos de raíz se presentaron en los tratamientos con estrés hídrico con relación a los tratamientos en donde se aplicó riego, tendencia que se observó tanto en maceta como en campo.

Lara *et al.* (2011), señalan que la utilización de microorganismos nativos presenta potencial para producción de biofertilizante y generación de ácido indol acético (AIA), y han demostrado ser eficientes al incrementar rendimientos y la calidad de cosecha en 80% en pastos comparado con el testigo. Terry *et al.* (2005), evaluaron microorganismos como biofertilizantes en tomate y obtuvieron incrementos de 11% comparado con el testigo. Chamizo *et al.* (2009), evaluaron el efecto de la inoculación de alfalfa con hongos micorrízicos arbusculares y rizobacterias en dos tipos de suelo, encontraron que el tipo de

suelo influye en el peso seco de la parte aérea de alfalfa y que la inoculación con rizobacterias estimula el crecimiento de plantas establecidas en suelo limoso, donde la materia seca presento 15% de aumento con relación a las plantas que no fueron inoculadas con las rizobacterias.

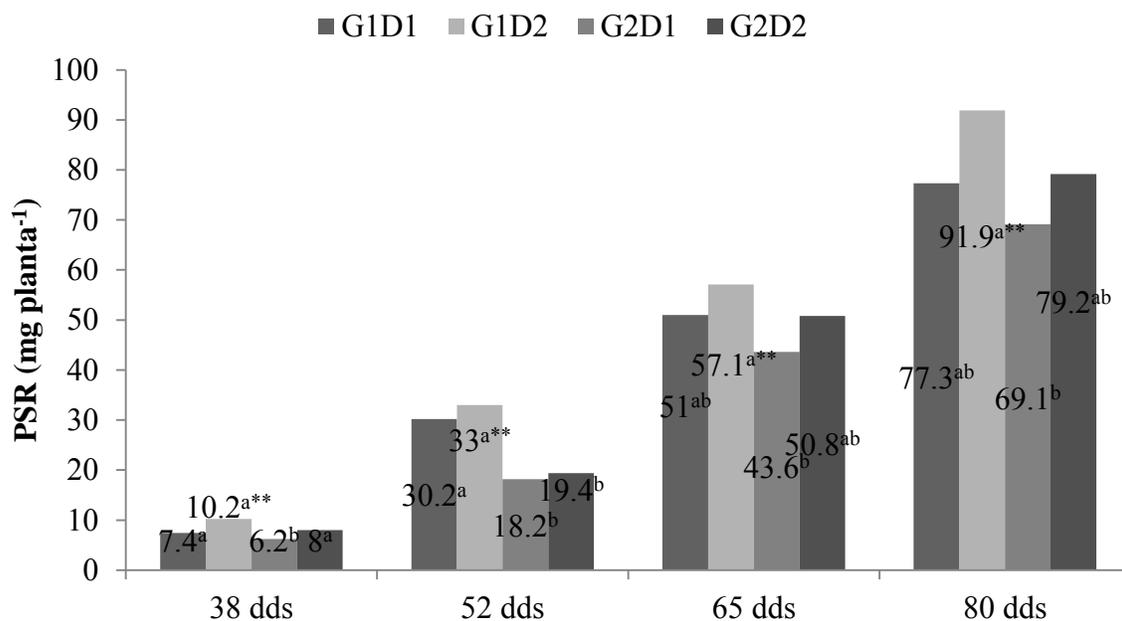


Figura 4.19. Efecto de la interacción genotipo por dosis de aplicación sobre peso seco de la raíz (PSR). G1=genotipo La Zarca; D1=inoculación de 0.5 ml; G2=genotipo 5; D2=inoculación de 1 ml. dds=días después de la siembra. NS no significativo, * y ** Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P<0.05$) y ($P<0.01$), respectivamente.

Pains *et al.* (2008), estudiaron el efecto de inoculación de 12 cepas de *A. amazonense* en arroz, observaron que el 50% de las cepas presentaron valores inferiores de peso seco de planta comparado con el testigo y el resto de las cepas presentaron valores similares con relación al testigo en peso seco de la planta y mencionan que es necesario determinar el tipo de inoculante bacteriano para cada región en particular. Canto *et al.* (2004), evaluaron el efecto de *Azospirillum* sobre el peso seco aéreo y radicular de chile habanero y reportan incremento de 300% de peso seco aéreo con inoculación de 10^7 ufc ml⁻¹, comparado con el testigo en suelo no estéril.

Cuadro 4.10. Efecto de la interacción genotipo por cepa sobre peso seco de raíz (mg planta⁻¹) en las diferentes fechas de muestreo.

| Interacción genotipo por cepa | 38 dds | 52 dds | 65 dds | 80 dds |
|-------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| G1C1 | 14.3 ^b | 24.0 ^d | 43.8 ^e | 78.5 ^{cd} |
| G1C2 | 4.5 ^{def} | 33.4 ^c | 60.4 ^b | 112.8 ^{a**} |
| G1C3 | 23.0 ^{a**} | 56.9 ^{a**} | 81.1 ^{a**} | 105.9 ^a |
| G1C4 | 4.3 ^{def} | 38.7 ^b | 46.8 ^{de} | 62.1 ^{ef} |
| G1C5 | 3.6 ^{efg} | 14.3 ^f | 42.9 ^e | 57.3 ^f |
| G1C6 | 3.0 ^{fg} | 22.4 ^d | 49.3 ^d | 90.9 ^b |
| G1C7 | 4.1 ^{defg} | 12.5 ^{fgh} | 43.8 ^{de} | 53.2 ^{fg} |
| G2C1 | 7.9 ^c | 17.2 ^{ef} | 35.1 ^f | 43.4 ^g |
| G2C2 | 5.6 ^{cde} | 8.8 ^h | 29.3 ^g | 77.2 ^{cd} |
| G2C3 | 6.4 ^{cd} | 22.8 ^d | 56.8 ^{bc} | 72.0 ^{de} |
| G2C4 | 11.9 ^b | 24.2 ^d | 45.7 ^{de} | 84.3 ^{bc} |
| G2C5 | 3.1 ^{efg} | 17.9 ^e | 54.8 ^c | 65.2 ^{ef} |
| G2C6 | 7.8 ^c | 22.0 ^d | 61.7 ^b | 102.7 ^a |
| G2C7 | 1.2 ^g | 11.6 ^{gh} | 48.3 ^{de} | 65.0 ^{ef} |

G1=genotipo La Zarca; G2=genotipo 5; C1=cepa a66; C2=cepa I27; C3=cepa I95; C4=cepa S73; C5=cepa ZA40; C6=consorcio; C7=testigo (sin inoculación). dds=días después de la siembra. ** Literales diferentes dentro de columna indican diferencia significativa ($P<0.01$).

Díaz *et al.* (2001), evaluaron el efecto de la inoculación en lechuga de 30 cepas que promueven el crecimiento vegetal, observaron que las cepas incrementaron en un rango de 100 hasta 400% el peso seco de la parte aérea con relación al testigo; por otro lado, esta mismas cepas aumentaron de 500 a 1500% el peso seco de raíz comparado con el testigo. González *et al.* (2011), evaluaron la respuesta de tres cultivares de maíz a la inoculación con *A. brasilense* bajo cuatro dosis de Nitrógeno, observaron que la inoculación con esta bacteria aumentó los rendimientos de grano en más de 1 t; además, disminuyó la duración del ciclo del cultivo; sin embargo, este efecto disminuyó al incrementar la dosis de fertilización nitrogenada.

Mehnaz y Lazarovits (2006), reportaron el efecto de la inoculación con bacterias en cuatro cultivares de maíz bajo invernadero y no encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) de peso seco de planta a 30 dds en suelo estéril. Felici *et al.* (2008), estudiaron el efecto de la inoculación sola y combinada de *B. subtilis* y *A. brasilense* en tomate y obtuvieron diferencias

significativas ($P<0.05$) para peso seco de la parte aérea, siendo los mayores promedios para la inoculación sola de *B. subtilis* y *A. brasilense* cuyos valores fueron superiores a 210 mg planta⁻¹ comparado con el testigo el cual solo alcanzó los 130 mg planta⁻¹ y para la inoculación combinada el promedio fue de 160 mg planta⁻¹, estadísticamente igual al testigo.

Cuadro 4.11. Efecto de la interacción dosis de inoculación por cepa evaluada (mg planta⁻¹) en las diferentes fechas de muestreo.

| Interacción | 38 dds | 52 dds | 65 dds | 80 dds |
|-------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| D1C1 | 12.7 ^b | 19.5 ^{ef} | 30.4 ^h | 46.8 ^j |
| D1C2 | 4.8 ^h | 18.7 ^f | 36.8 ^g | 78.3 ^f |
| D1C3 | 10.7 ^c | 38.5 ^b | 71.3 ^{a**} | 94.9 ^c |
| D1C4 | 6.1 ^f | 31.2 ^c | 45.2 ^f | 72.4 ^g |
| D1C5 | 2.2 ⁱ | 14.0 ^g | 47.1 ^{ef} | 58.4 ⁱ |
| D1C6 | 4.3 ^h | 23.6 ^d | 53.0 ^d | 88.3 ^d |
| D2C1 | 9.5 ^e | 21.7 ^{de} | 48.5 ^e | 75.1 ^{fg} |
| D2C2 | 5.4 ^g | 23.5 ^d | 52.9 ^d | 111.7 ^{a**} |
| D2C3 | 18.7 ^{a**} | 41.2 ^{a**} | 66.6 ^b | 83.0 ^e |
| D2C4 | 10.1 ^d | 31.7 ^c | 47.3 ^{ef} | 74.0 ^g |
| D2C5 | 4.4 ^h | 18.2 ^f | 50.6 ^{de} | 64.1 ^h |
| D2C6 | 6.6 ^f | 20.8 ^e | 57.9 ^c | 105.3 ^b |

D1=dosis 0.5 ml de inóculo; D2=dosis 1 ml de inóculo; C1=cepa a66; C2=cepa I27; C3=cepa I95; C4=cepa S73; C5=cepa ZA40; C6=consorcio. dds=días después de la siembra. ** Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P<0.01$).

García *et al.* (2005), evaluaron el efecto de la inoculación del trigo con *Azospirillum* spp. y *Azotobacter beijerinckii*, observando diferencias significativas ($P<0.01$) con los mayores promedios de peso seco de planta para *A. brasilense* y 80 kg ha⁻¹ de urea de 9.6 g planta⁻¹, diferente a la inoculación con *A. lipoferum* y 80 kg ha⁻¹ de urea con 7.6 g planta⁻¹, también, diferente a 6 g planta⁻¹ para la inoculación combinada de *A. brasilense* y *A. lipoferum*, siendo los menores promedios de 5.4, 5.0 y 4.5 g planta⁻¹ y no diferentes entre si para la inoculación de *Azotobacter beijerinckii*, aplicación de 160 kg ha⁻¹ de urea y el testigo, respectivamente.

Cuadro 4.12. Efecto de la interacción de genotipo por cepa por dosis de inoculación sobre PSR (mg planta⁻¹) en los diferentes muestreos destructivos.

| 38 dds | | | | | 52 dds | | | | |
|--------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| G1 | | G2 | | | G1 | | G2 | | |
| C | D1 | D2 | D1 | D2 | C | D1 | D2 | D1 | D2 |
| C1 | 14.2 ^{bA} | 14.5 ^{bA} | 11.2 ^{a**B} | 4.6 ^{dC} | C1 | 20.2 ^{dB} | 27.8 ^{cA} | 18.8 ^{cB} | 15.5 ^{cC} |
| C2 | 4.9 ^{cB} | 4.2 ^{dB} | 4.6 ^{dB} | 6.5 ^{cA} | C2 | 29.5 ^{cB} | 37.3 ^{bA} | 7.8 ^{dC} | 9.7 ^{dC} |
| C3 | 15.5 ^{a**B} | 30.5 ^{a**A} | 5.9 ^{cD} | 7.0 ^{cC} | C3 | 51.7 ^{a**B} | 62.0 ^{a**A} | 25.2 ^{a**C} | 20.4 ^{bD} |
| C4 | 3.5 ^{cD} | 5.0 ^{cC} | 8.6 ^{bB} | 15.2 ^{a**A} | C4 | 39.6 ^{bA} | 37.8 ^{bA} | 22.8 ^{aB} | 25.6 ^{a**B} |
| C5 | 3.2 ^{cB} | 4.0 ^{deB} | 1.2 ^{eC} | 4.9 ^{dA} | C5 | 12.0 ^{eC} | 16.6 ^{dB} | 16.0 ^{cB} | 19.8 ^{bA} |
| C6 | 2.8 ^{cC} | 3.3 ^{eC} | 5.7 ^{cB} | 10.0 ^{bA} | C6 | 28.5 ^{cA} | 16.2 ^{dC} | 18.7 ^{cC} | 25.4 ^{aB} |
| 65 dds | | | | | 80 dds | | | | |
| G1 | | G2 | | | G1 | | G2 | | |
| C | D1 | D2 | D1 | D2 | C | D1 | D2 | D1 | D2 |
| C1 | 34.8 ^{cC} | 52.8 ^{cA} | 26.0 ^{ed} | 44.2 ^{dB} | C1 | 58.2 ^{dB} | 98.8 ^{cA} | 35.4 ^{Id} | 51.4 ^{eC} |
| C2 | 53.0 ^{bB} | 67.8 ^{bA} | 20.5 ^{fD} | 38.0 ^{eC} | C2 | 99.8 ^{bB} | 125.8 ^{a**A} | 56.8 ^{eC} | 97.6 ^{bB} |
| C3 | 83.0 ^{a**A} | 79.2 ^{a**B} | 59.7 ^{a**C} | 54.0 ^{bD} | C3 | 115.8 ^{a**A} | 96.0 ^{cB} | 74.0 ^{cC} | 70.0 ^{dC} |
| C4 | 455.6 ^{cNS} | 48.0 ^d | 44.7 ^d | 46.6 ^c | C4 | 59.2 ^{dC} | 65.0 ^{dB} | 85.6 ^{bA} | 83.0 ^{cA} |
| C5 | 41.0 ^{dC} | 44.8 ^{dB} | 53.2 ^{cA} | 56.4 ^{bA} | C5 | 54.6 ^{dC} | 60.0 ^{eB} | 62.2 ^{dB} | 68.2 ^{dA} |
| C6 | 48.3 ^{cC} | 50.2 ^{cdC} | 57.7 ^{aB} | 65.6 ^{a**A} | C6 | 76.2 ^{cd} | 105.6 ^{bA} | 100.4 ^{a**A} | 105.0 ^{a**A} |

G1=genotipo La Zarca; G2=genotipo 5; D1=dosis 0.5 ml de inóculo; D2=dosis 1 ml de inóculo; C1=cepa a66; C2=cepa I27; C3=cepa I95; C4=cepa S73; C5=cepa ZA40; C6=consorcio. dds=días después de la siembra. NS no significativo, ** Literales diferentes minúsculas indican diferencia significativa dentro de columnas y literales mayúsculas dentro de fila, indican diferencia significativa ($P<0.01$).

4.3.4. Tasa de crecimiento del forraje

Para tasa de crecimiento del cultivo de la parte aérea (TCPSA) G1 fue superior en 2 mg planta⁻¹ día⁻¹ y 0.9 mg planta⁻¹ día⁻¹ ($P<0.1$; Fig.4.20) con relación a G2, en primero y segundo muestreo, respectivamente. En el tercer muestreo no se observaron diferencias ($P>0.05$) entre genotipos.

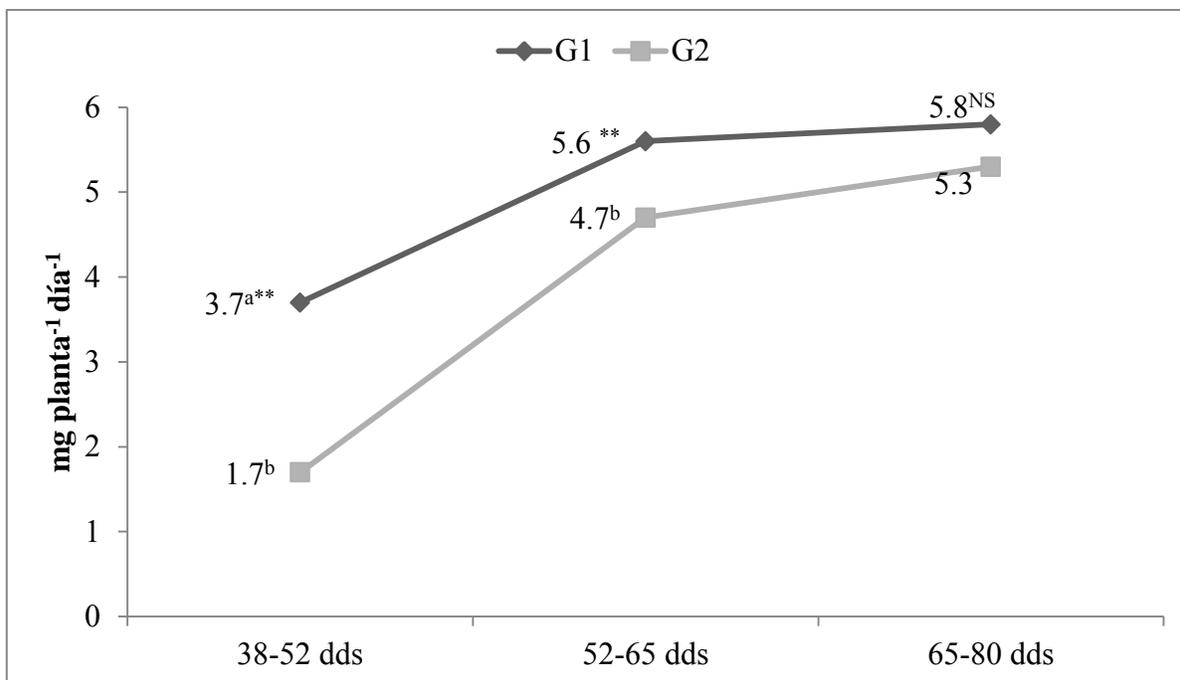


Figura 4.20. Tasa de crecimiento del cultivo de la parte aérea en dos genotipos evaluados por fecha de muestreo. G1=genotipo La Zarca; G2=genotipo 5. dds=días después de la siembra. NS no significativo; ** Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P<0.01$).

Las cepas C4 y C6 fueron las que presentaron las mayores tasas de crecimiento con relación al testigo ($P<0.01$; Cuadro 4.13.) en TCPSA. La inoculación con el consorcio incrementa la tasa de crecimiento, es necesario evaluar el consorcio en condiciones de campo.

Para la tasa de crecimiento de la parte seca de raíz (TCPSR) G1 presentó los mayores promedios ($P<0.01$; Fig. 420) comparado con G2.

Las mayores TCPSR se obtuvieron en C3 y C2 ($P<0.01$; Cuadro 4.14), las cepas que incrementan la producción de materia seca aérea no siempre aumentan el peso seco de raíz, lo cual puede ser recíproco.

Cuadro 4.13. Tasa de crecimiento del cultivo de la parte aérea con las diferentes cepas evaluadas y diversas fechas de muestreos destructivos.

| Cepa | 38-52 dds | Inc | 52-65 dds | Inc | 65-80 dds | Inc |
|------|---|-----|---|-----|---|-----|
| | mg planta ⁻¹ día ⁻¹ | % | mg planta ⁻¹ día ⁻¹ | % | mg planta ⁻¹ día ⁻¹ | % |
| C1 | 1.7 ^c | 13 | 4.8 ^c | -21 | 5.9 ^b | 90 |
| C2 | 2.9 ^{ab} | 93 | 5.8 ^{ab} | -5 | 5.6 ^b | 81 |
| C3 | 3.2 ^{ab} | 113 | 4.3 ^{cd} | -29 | 5.0 ^b | 61 |
| C4 | 3.3 ^{a**} | 120 | 3.7 ^d | -39 | 8.3 ^{a**} | 168 |
| C5 | 2.4 ^{bc} | 60 | 5.1 ^{bc} | -16 | 3.3 ^c | 7 |
| C6 | 3.0 ^{ab} | 100 | 6.6 ^{a**} | 8 | 6.3 ^b | 103 |
| C7 | 1.5 ^c | --- | 6.1 ^{ab} | --- | 3.1 ^c | --- |

Tasa de crecimiento de la parte aérea por cepa evaluada. C1=cepa a66; C2=cepa I27; C3=cepa I95; C4=cepa S73; C5=cepa ZA40; C6=consorcio; C7=testigo (sin inoculación). Inc=incremento. ** Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P<0.01$).

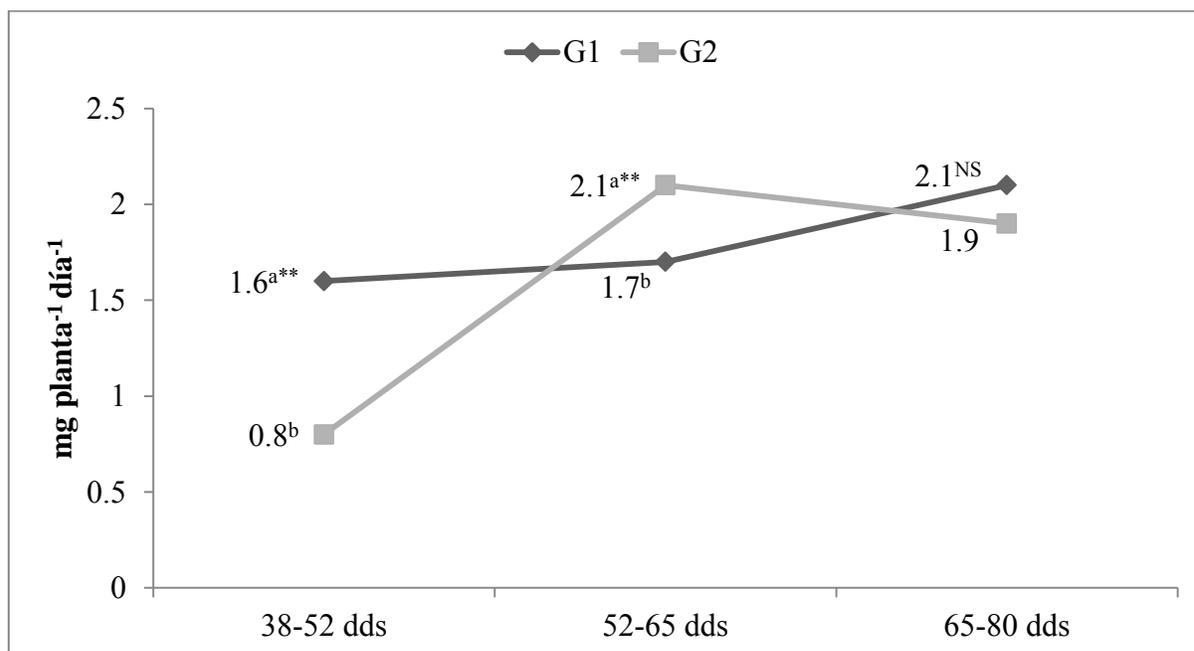


Figura 4.21. Tasa de crecimiento del cultivo de la raíz en dos genotipos evaluados por fecha de muestreo. G1=genotipo La Zarca; G2=genotipo 5. dds=días después de la siembra. NS no significativo; ** Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P<0.01$).

Cuadro 4.14. Tasa de crecimiento del cultivo de la raíz con las diferentes cepas evaluadas y diversas fechas de muestreos destructivos.

| Cepa | 38-52 dds | Inc | 52-65 dds | Inc | 65-80 dds | Inc |
|------|---|-----|---|-----|---|-----|
| | mg planta ⁻¹ día ⁻¹ | % | mg planta ⁻¹ día ⁻¹ | % | mg planta ⁻¹ día ⁻¹ | % |
| C1 | 0.7 ^c | 0 | 1.3 ^c | -46 | 1.5 ^{cd} | 67 |
| C2 | 1.2 ^b | 71 | 1.7 ^b | -29 | 3.6 ^{a**} | 300 |
| C3 | 1.8 ^{a**} | 157 | 2.1 ^a | -12 | 1.4 ^{de} | 56 |
| C4 | 1.7 ^a | 143 | 1.0 ^c | -58 | 1.9 ^c | 111 |
| C5 | 0.9 ^{bc} | 29 | 2.3 ^a | -4 | 0.9 ^e | 0 |
| C6 | 1.2 ^b | 71 | 2.4 ^a | 0 | 2.9 ^b | 222 |
| C7 | 0.7 ^c | --- | 2.4 ^{a**} | --- | 0.9 ^e | --- |

Tasa de crecimiento de la raíz por cepa evaluada. C1=cepa a66; C2=cepa I27; C3=cepa I95; C4=cepa S73; C5=cepa ZA40; C6=consorcio; C7=testigo (sin inoculación). Inc=incremento. ** Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P<0.01$).

4.4. Conclusiones

La inoculación de bacterias benéficas en la prueba de germinación estándar mostró efecto de asociación.

El consorcio bacteriano presentó las mayores germinaciones con relación a las demás cepas evaluadas.

La dosis de inoculación tuvo efecto en la germinación.

La dosis alta mostró los menores porcentajes de germinación.

Para altura de planta, se observaron diferencias entre los genotipos evaluados siendo G1 el que presentó mayor altura; así mismo, el consorcio presentó las mayores alturas seguido de C3 y C4 en los genotipos evaluados.

Con C6 se incrementó el 49.9% de peso seco de la parte aérea vegetal, con relación al testigo a 80 dds.

Los mayores pesos de raíz se observaron en G1; sin embargo, la dosis de inoculación varió dependiendo el genotipo.

Los mayores pesos secos de raíz se observaron en el G1, la dosis de inoculación mayor, incremento el peso de raíz, las cepas C6, C2 y C3 presentaron los mayores valores, superando al testigo.

Las cepas evaluadas se asocian con los genotipos estudiados.

4.5. Literatura Citada

- Abril, A., C. Biasutti, R. Maich, L. Dubbini y L. Noe. 2006. Inoculación con *Azospirillum* spp. en la región semiárida-central de Argentina: factores que afectan la colonización rizosférica. *CI. Suelo (Argentina)* 24(1): 1-9.
- Acebo, Y., N. Rives., M. Heydrich., A. Hernández. 2007. Efecto promotor del crecimiento vegetal de cepas de *Azospirillum* sp., en el cultivo del arroz. *Cultivos Tropicales* 28(3): 29-32.
- Adesemoye, A. O., H. A. Torbert and J. W. Kloepper. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb Ecol* 58: 921-929.
- Barassi, C. A., G. Ayrault, C. M. Creus, R. J. Sueldo and M. T. Sobrero. 2006. Seed inoculation with *Azospirillum* mitigates NaCl effects on lettuce. *Scientia Horticulturae* 109: 8-14.
- Bécquer, C. J., B. Salas, U. Ávila, A. Palmero, J. A. Nápoles, Y. Ramos, I. Pasarón y L. Ulloa. 2011. Efecto de la inoculación con rizobios procedentes de Alberta, Canadá, en sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), en condiciones de campo. *Pastos y Forraje* 34(3): 303-312.
- Bécquer, C. J., A. Nápoles, N. F. Fajardo, L. A. Palmero, U. Ávila, O. Álvarez, Y. Ramos, M. Quintana, Y. Galdo y S. Vega. 2012. Efecto de la inoculación con *Bradyrhizobium* spp. y de la fertilización nitrogenada en dos variedades de sorgo grano (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Pastos y Forrajes* 35(1): 67-78.
- Bécquer, G. C. J., D. Prévost, C. Juge, C. Gauvin y S. Delaney. 2012a. Efecto de la inoculación con bacterias rizosféricas en dos variedades de trigo. Fase I: condiciones controladas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3(5): 973-984.
- Bécquer, G. C. J., G. Lazarovits, L. Nielsen, M. Quintan, M. Adesina, L. Quigley, I. Lalin y C. Ibbotson. 2012b. Efecto de la inoculación con bacterias rizosféricas en dos variedades de trigo. Fase II: invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3(5): 985-997.

- Canto, M. J. C., S. Medina y D. Morales. 2004. Efecto de la inoculación con *Azospirillum* sp. en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacquin). *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 4(1): 21-27.
- Carrillo-Castañeda, G., J. Juárez, D. Ruiz y R. Müller. 2000. Aumento del rendimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) cuando la raíz se desarrolla por microorganismos *Biología Aplicada* 17: 171-176.
- Cassán, F., D. Perrig, V. Sgroy, O. Masciarelli, C. Penna and V. Luna. 2009. *Azospirillum brasilense* AZ39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of Soil Biology* 45: 28-35.
- Chamizo, A., R. Ferrera-Cerrato, M. C. González-Chávez, C. A. Ortiz-Solorio, J. A. Santizo-Rincón, L. Varela y A. Alarcón. 2009. Inoculación de alfalfa con hongos micorrízicos arbusculares y rizobacterias en dos tipos de suelo. *Terra Latinoamericana* 27: 197-205.
- Del Pozo, P. P., R. S. Herrera, M. García, A. M. Cruz y A. Romero. 2001. Análisis de crecimiento y desarrollo del pasto estrella con y sin adición de fertilizante nitrogenado. *Revista Cubana Ciencia Agrícola* 35(1): 51-58.
- Díaz-Vargas, P., R. Ferrera-Cerrato, J. J. Almaraz-Suárez y G. Alcántar-González. 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra Latinoamericana* 19: 327-335.
- Döbereiner, J; Day, DJ. 1974. Associative symbiosis in tropical grasses of microorganisms and dinitrogen fixing site. In Newton, W; Nyam, CJ. eds. *Proceedings of the 1st. International Symposium on Nitrogen Fixation*. Washington State University Press. Pullman, USA. 2: 518-539.
- Felici, C., L. Vettori, E. Giraldi, L. M. Constantina, A. Toffanin, A.M. Tagliasacchi and M. Nuti. 2008. Single and co-inoculation of *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* on *Lycopersicon esculentum*: effects on plant growth and rhizosphere microbial community. *Applied Soil Ecology* 40: 260-270.
- Fischer, S. E., S. I. Fischer, S. Magris and G. B Mori. 2007. Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere of wheat. *World Microbiol Biotechnol* 23: 895-903.

- García-González, M. M., R. Farías-Rodríguez, J. J. Peña-Cabriales y J. M. Sánchez-Yáñez. 2005. Inoculación de trigo var. Pavón con *Azospirillum* spp. y *Azotobacter beijerinckii*. Terra Latinoamericana 23(1): 65-72.
- García-Olivares, J. G., V. R. Moreno-Medina, I. C. Rodríguez-Luna, A. Mendoza-Herrera y N. Mayek-Pérez. 2007. Efecto de cepas de *Azospirillum brasilense* en el crecimiento y rendimiento de grano de maíz. Rev. Fitotec. Mex 30(3): 305-310.
- González, H. A., D. J. Pérez, O. Franco, A. Balbuena, F. Gutiérrez y H. Romero. 2011. Respuesta de tres cultivares de maíz a la inoculación con *Azospirillum brasilense* bajo cuatro diferentes dosis de nitrógeno. Ciencia Ergo Sum 18(1): 51-58.
- Grageda-Cabrera, O. A., A. Díaz-Franco, J. J. Peña-Cabriales y J. A. Vera-Nuñez. 2012. Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 3(6): 1261-1274.
- Guzmán, A., M. Obando, D. Rivera y R. Bonilla. 2012. Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). Rev. Colomb. Biotecnol 14(1): 182-190.
- Ilyas, N and A. Bano. 2010. *Azospirillum* strains isolated from roots and rhizosphere soil of wheat (*Triticum aestivum* L.) grown under different soil moisture conditions. Biol Fertil Soils 46: 393-406.
- International Seed Testing Association (ISTA). 2005. International rules for seed testing. Seed Sci. and Technol. Edition 2005/1.P.O. BOX 308,8303 Bassersdorf, CH-Switzerland.
- Lara, M. C., L. E. Oviedo y C. A. Betancur. 2011. Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar los pastos. Zootecnia Tropical 29(2): 187-194.
- López, M., R. Martínez, M. Brossard, A. Bolívar, N. Alfonso, A. Alba y H. Pereira. 2008. Efecto de biofertilizantes bacterianos sobre el crecimiento de un cultivar de maíz en dos suelos contrastantes de Venezolanos. Agronomía Tropical 58(4): 391-401.
- Luna, M. L., R. A. Martínez, M. Hernández, S. M. Arvizu y J. R. Pacheco. 2013. Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. Rev. Fitotec. Mex 36(1): 63-69.

- McFarland, J. 1970. The nephelometer: An instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. pp. 435-437. *In*: H.D. Campbell, S.J. Garvey, E.N. Cremer y H.D. Sussdorf (eds.). *Methods in immunology*. Benjamin. New York.
- Mehnaz, S and G. Lazarovits. 2006. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microbial Ecology* 51: 326-335.
- Morales, N.C.R.; Quero, C.A.R.; Le, B.O.; Hernández, G.A.; Pérez, P.J.; González, M.S. 2006. Caracterización de la diversidad del pasto nativo *Bouteloua curtipendula* Michx. Torr., mediante marcadores de AFLP. *Agrociencia* 40(6): 711-720.
- Morales, N. C. R.; Quero, C. A. R.; Avendaño, A. C. U. 2007. Caracterización de la diversidad nativa del zacate banderita [*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.], mediante su nivel de ploidía. *Téc Pecu Méx* 45(3): 263-278.
- Morales, N.C.R.; Quero, C.A.R.; Pérez, P.J.; Hernández, G.A.; Le, B.O. 2008. Caracterización morfológica de poblaciones nativas de pasto banderita [*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.] en México. *Agrociencia* 42(7): 767-775.
- Morales, N.C.R.; Madrid, P.L.; Melgoza, C.A.; Martínez, S.M.; Arévalo, G.S.; Rascón, C.Q.; Jurado, G.P. 2009. Análisis morfológico de la diversidad del pasto navajita [*Bouteloua gracilis* (Willd. ex Kunth) Lag. ex Steud.], en Chihuahua, México. *Téc Pecu Méx* 47(3): 245-256.
- Pains, R. E., L. Santos, A. L. Martínez, V. L. D. Baldani, K. R. Dos Santos, S. Urquiaga y V. Massena. 2008. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Soil* 302: 249-261.
- Planes-Leyva, M., E. Utria-Borges, J. O. Calderón-Agüero, A. O. Terry-Lamothe, I. Figueroa-Santana y A. Lores. 2004. La biofertilización como herramienta biotecnológica de la agricultura sostenible. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 10(1): 5-10.
- Quero, C.A.; Morales, C.R.; Miranda, L.; Enríquez, J.F. 2003. Recursos genéticos de gramíneas forrajeras nativas. El complejo del zacate banderita *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr. (Resumen). En: Memoria XXXIX Reunión Nacional de investigación pecuaria. UNAM México. DF. pp 424.

- Quero, C.A.R.; Enríquez, Q.J.F.; Miranda, J.L. 2007. Evaluación de especies forrajeras en América tropical, avances o status quo. (Ensayos) *Interciencia* 32(8): 566-571.
- Quero, C.A.R.; Enríquez, J.F.; Morales, N.C.R.; Miranda, J.L. 2010. Apomixis y su importancia en la selección y mejoramiento de gramíneas forrajeras tropicales. Revisión. *Téc Pecu Méx* 48(1): 25-42.
- Rojas, S. J y N. Moreno-Sarmiento. 2008. Producción y formulación de prototipos de un biofertilizante a partir de bacterias nativas asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista Colombiana de Biotecnología* 10(2): 50-62.
- Rueda-Puente, E. O., J. A. Villegas-Espinoza, L. E. Gerlach-Barrera, M. A. Tarazón-Herrera, B. Murillo-Amador, J. L. García-Hernández, E. Troyo-Diéguéz y P. Preciado-Rangel. 2009. Efecto de la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal sobre la germinación de *Salicornia bigelovii*. *Terra Latinoamericana* 27: 345-354.
- Sampaio, V. S., D. Messias, R. Fiusa, W. Lustrino, V. L. Divan and J. I. Baldani. 2012. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum., genotypes grown in the field. *Plant Soil* 356: 51-66.
- Sánchez, L. D. B., R. M. Gómez, M. F. Garrido y R. R. Bonilla. 2012. Inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3(7): 1401-1415.
- Statistical Analysis System (SAS). 2003. User's Guide: statistics. Version 9.1. SAS Institute Inc. Cary, NC. USA.
- Terry, A. E., A. Leyva y A. Hernández. 2005. Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Revista Colombiana de Biotecnología* 7(2): 47-54.
- Villegas-Espinoza, J. A., E. O. Rueda-Puente, B. Murillo-Amador, M. E. Puente, O. Grimaldo-Juárez, S. M. Avilés, J. F. Ponce-Medina. 2010. Efecto de la inoculación de *Azospirillum halopraeferens* y *Bacillus amyloliquefaciens* en la germinación de *Prosopis chilensis*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 12(1): 19-32.
- Zaragoza, E. J., A. Hernández, J. Pérez, J. G. Herrera, F. Osnaya, P. A. Martínez, S. S. González y A. R. Quero. 2009. Análisis de crecimiento estacional de una pradera asociada alfalfa-pasto ovinillo. *Téc Pecu Méx* 47(2): 173-188.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES

Cada localidad en donde se realizaron los muestreos de suelo presenta características específicas con gran interacción entre microorganismos que contribuyen con el crecimiento de las plantas.

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal estudiadas pueden ser una opción para generar inoculantes que puedan utilizarse en praderas de regiones áridas y semiáridas de México.

Es importante evaluar las diferentes cepas estudiadas en condiciones de campo para determinar su potencial bajo condiciones de competencia con factores bióticos y abióticos.

Es necesario realizar estudios socioeconómicos para determinar hasta qué nivel se pueden sustituir fertilizantes fósiles con microorganismos

Es importante determinar un paquete tecnológico práctico, sencillo y económico para productores.

CAPÍTULO VI. APÉNDICE

Cuadro A1. Características morfológicas de las bacterias desarrolladas en placa

| FORMA | BORDE | ELEVACIÓN |
|---|---|--|
|  Puntiforme |  Entero |  Plana |
|  Circular | |  Elevada |
|  Rizoide |  Ondulado |  Convexa |
|  Amiboide |  Lobulado | |
|  Filamentosa | |  Pulvinada |
|  Fusiforme |  Filamentoso (como La colonia) |  Umbonada |

Textura: Acuosa, Viscosa, Membranosa, Butirosa, Seca

Cuadro A2. Medio NFb para el género *Azospirillum* (Döbereiner y Day, 1974).

| Compuesto | Cantidad | Comentarios |
|--|----------|---|
| K ₂ HPO ₄ | 0.10 g | |
| NaCl | 0.10 g | |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.20 g | |
| CaCl ₂ | 0.02 g | |
| FeCl | 0.01 g | Disolver los reactivos y ajustar el pH a 7. |
| KH ₂ HPO ₄ | 0.40 g | |
| Na MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.002 g | |
| DL-ácido Málico | 5 g | |
| Biotina | 0.0001 g | |
| Azul de Bromotimol (5%) | 2 ml | * Para la solución de azul de Bromotimol al 5%, disolver en etanol o en solución de KOH |
| Agar (0.7%) | 20 g | |
| Agua destilada | 1000 ml | |

Cuadro A3. Medio de cultivo Rojo Congo (Rodríguez, 1982).

| Compuesto | Cantidad | Comentarios |
|--------------------------------------|-----------------|---|
| K ₂ HPO ₄ | 0.5 g | |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.2 g | |
| NaCl | 0.1 g | |
| Extracto de levadura | 0.5 g | |
| FeCl ₃ .6H ₂ O | 0.015 g | Disolver los reactivos y ajustar el pH a 7, con 0.1 |
| <i>DL</i> -ácido Málico | 5 g | N de KOH |
| KOH | 4.8 g | |
| Rojo Congo 1:400 | 15 ml | |
| Agar (0.7 %) | 15 g | |
| Agua destilada | 1000 ml | |

Cuadro A4. Características morfológicas de colonias aisladas para cinco localidades evaluadas.

| Cepa | Forma | Elevación | Borde | Textura | Color | Observaciones |
|------|-------------|-----------|-------------|---------|---|---|
| A32 | Circular | Elevada | Ondulada | Acuosa | Crema brillante | |
| A37 | Circular | Elevada | Ondulada | Acuosa | Crema brillante | |
| A39 | Puntiforme | Plana | Entero | Acuosa | Crema brillante | |
| A84 | Circular | Plana | Ondulada | Acuosa | Crema opaca | |
| A110 | Circular | Plana | Ondulada | Acuosa | Crema brillante | Conforme crece en el centro es café |
| A119 | Filamentosa | Plana | Filamentosa | Acuosa | Azul brillante | Conforme crece el centro es anaranjado |
| a28 | Circular | Elevada | Entero | Acuosa | Crema opaca en el centro, en el borde brillante | |
| a30 | Circular | Pulvinada | Entero | Acuosa | Crema opaca en el centro, en el borde brillante | |
| a63 | Amiboide | Plana | Lobulada | Seca | Blanca brillante | Conforme crece es crema brillante |
| a66 | Circular | Convexa | Ondulada | Seca | Blanca brillante | Conforme crece el centro es crema opaca y borde brillante |
| I10 | Circular | Pulvinada | Entero | Acuosa | Blanca brillante | Conforme crece en el centro es café y borde brillante |
| I14 | Circular | Pulvinada | Lobulada | Acuosa | Blanca brillante | Conforme crece en el centro es café y borde brillante |
| I15 | Circular | Convexa | Ondulada | Acuosa | Crema café, en el borde es brillante | Conforme crece arriba en la superficie forma una costra |

| | | | | | | |
|------|----------|---------|----------|--------|---|---|
| I27 | Circular | Elevada | Ondulada | Acuosa | Crema, en el borde es brillante | |
| I30 | Circular | Plana | Ondulada | Acuosa | Azul brillante, en el centro anaranjada | |
| I40 | Circular | Elevada | Ondulada | Acuosa | Crema opaca, el borde es brillante | |
| I50 | Circular | Elevada | Entero | Acuosa | Azul brillante en el centro anaranjada | |
| I52 | Circular | Elevada | Ondulada | Acuosa | Crema brillante | |
| I62 | Circular | Elevada | Ondulada | Acuosa | Crema brillante | |
| I95 | Circular | Plana | Ondulada | Acuosa | Azul opaca, en el centro amarillo | |
| S73 | Circular | Plana | Ondulada | Seca | Blanca brillante en el centro es gris | |
| S137 | Amiboide | Plana | Lobulada | Seca | Blanca brillante | En el centro forma un círculo café |
| ZA40 | Amiboide | Plana | Lobulada | Seca | Blanca brillante | Conforme crece forma en el centro un círculo café |
| ZA44 | Circular | Elevada | Ondulada | Acuosa | Crema brillante | |
| ZA47 | Circular | Plana | Entero | Acuosa | Azul brillante en el centro es amarillo | |

Localidades. 1) representada con las iniciales A; 2) a; 3) I; 4) S; 5) ZA con su número de identificación, respectivamente.

Cuadro A5. Escala de McFarland

| Clave del tubo | BaCl ₂ al 1% (ml) | H ₂ SO ₄ al 1% (ml) | No. Estimado de bacterias x10 ⁶ ml |
|----------------|------------------------------|---|---|
| 1 | 0.1 | 9.9 | 300 |
| 2 | 0.2 | 9.8 | 600 |
| 3 | 0.3 | 9.7 | 900 |
| 4 | 0.4 | 9.6 | 1200 |
| 5 | 0.5 | 9.5 | 1500 |
| 6 | 0.6 | 9.4 | 1800 |
| 7 | 0.7 | 9.3 | 2100 |
| 8 | 0.8 | 9.2 | 2400 |
| 9 | 0.9 | 9.1 | 2700 |
| 10 | 1.0 | 9.0 | 3000 |

Procedimiento para obtener la población de microorganismos:

Se marcaron los tubos del 1 al 10

Se prepararon los 10 tubos de acuerdo con los volúmenes indicados en la tabla

Con el espectrofotómetro, se determinó la turbidez de cada tubo, posterior a la calibración del equipo con tubo con agua destilada

Se obtuvo un modelo de regresión lineal, ubicando en la ordenada los valores de la densidad óptica obtenidos en cada tubo y en la abscisa los valores del número estimado de bacterias y se graficó

Se obtuvo turbidez de los tubos de interés de acuerdo a la población estimada en cada tubo, antes se calibró el equipo en cero con tubo con medio de cultivo utilizando.

Se estimó la cantidad de bacterias contenidas en cada tubo, de cada bacteria en estudio.