



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA



**DISEÑO DE INOCULANTE DE SEGUNDA
GENERACIÓN TOLERANTE A CONDICIONES DE
DESECACIÓN**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR (A) EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

PRESENTA:

M.C. Dalia Molina Romero

ASESOR DE TESIS:

D.C. Jesús Muñoz Rojas

Co-ASESOR:

D.C. Miguel Castañeda Lucio



El presente proyecto se realizó en el Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

El trabajo fue asesorado por el siguiente comité tutorial:

D.C. Luis Ernesto Fuentes Ramírez

D.C. Ricardo Carreño López

D.C. Alma Rosa Netzahuatl Muñoz

D.C. Lucía Martínez Martínez

Se agradece el apoyo brindado de CONACyt para la realización de esta tesis, con número de becario : 43375

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN	5
INOCULANTES	17
INOCULANTES DE SEGUNDA GENERACIÓN: CONSORCIOS MICROBIANOS.	18
RELACIONES ANTAGÓNICAS	19
MAÍZ E INOCULANTES	20
DESECACIÓN BACTERIANA	25
ANTECEDENTES	27
JUSTIFICACIÓN	29
HIPÓTESIS	30
OBJETIVO GENERAL	30
OBJETIVO PARTICULAR	30
MATERIAL Y MÉTODOS	30
ENSAYO DE ANTAGONISMO	30
ENSAYO DE DESECACIÓN	31
CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA <i>ACYNETOBACTER</i> SP. EMM02.	31
COMPATIBILIDAD DE LAS CEPAS BACTERIANAS SELECCIONADAS PARA EL INOCULANTE MULTI-ESPECIES BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE CRECIMIENTO.	31
INFLUENCIA DEL TIPO DE SUELO SOBRE LA RESISTENCIA A LA DESECACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS PARA FORMULAR LA MEZCLA BACTERIANA.	32
CARACTERÍSTICAS PARA PROMOVER EL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE LAS CEPAS SELECCIONADAS PARA FORMULAR EL INOCULANTE MULTIESPECIES.	32
MEDIOS DE SELECCIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS DEL INOCULANTE MULTI-ESPECIE.	33
OBTENCIÓN DE MAÍZ AXÉNICO	34
OBTENCIÓN DE LA SUSPENSIÓN BACTERIANA PARA INOCULAR SEMILLAS DE MAÍZ	34
ENSAYOS DE DESECACIÓN DE SEMILLAS INOCULADAS	34
SEMBRADO DE LAS SEMILLAS, ADHESIÓN Y COLONIZACIÓN BACTERIANA	35
EVALUACIÓN DE LA ESTIMULACIÓN DE CRECIMIENTO	36
RESULTADOS	37
ENSAYOS DE ANTAGONISMO PARA LA SELECCIÓN DE CEPAS COMPATIBLES	37
ENSAYOS DE DESECACIÓN	37
CARACTERÍSTICAS PARA PROMOVER EL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE LAS CEPAS SELECCIONADAS PARA FORMULAR EL INOCULANTE MULTIESPECIES.	38

EVALUACIÓN DE LA PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS SELECCIONADAS PARA FORMULAR EL INOCULANTE MULTIESPECIES.	39
RESULTADOS DEL EXPERIMENTO 1: CRECIMIENTO DE MAÍZ INOCULADO CON 5 CEPAS BACTERIANAS EN FORMA INDIVIDUAL Y EN CONSORCIO, BAJO CONDICIONES SIN ESTRÉS POR TEMPERATURA (25-30 °C) Y CON ESTRÉS DE TEMPERATURA (35-45 °C).	39
RESULTADOS DEL EXPERIMENTO 2: MAÍZ INOCULADO INDIVIDUAL Y CON EL CONSORCIO (4 CEPAS) BAJO CONDICIONES DE HIDRATACIÓN ÓPTIMA ANTES DE LA GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS ENTRE 25-30 °C.	57
RESULTADOS DEL EXPERIMENTO 3: EFECTO EN LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO MAÍZ INOCULADO INDIVIDUAL Y CON EL CONSORCIO BAJO CONDICIONES DE DESECACIÓN ANTES DE LA GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS ENTRE 25-30 °C.	58
TABLA S1. CEPAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO.	81
TABLA S2. IDENTIDAD DE LA SECUENCIA DEL GEN 16S rRNA DE LA CEPA <i>ACINETOBACTER SP. EMM02</i> (KU686485)	82
S1. DIAGRAMA DE FLUJO DE LA IDENTIFICACIÓN DE <i>ACINETOBACTER SP. EMM02</i>.	83
FIG. S2. COMPATIBILIDAD DE LAS CEPAS BACTERIANAS SELECCIONADAS PARA EL INOCULANTE MULTI-ESPECIES	84
FIG.S3 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DE SUELO ARENOSO Y ARENOSO LIMOSO USADO COMO SOPORTE PARA EXPERIMENTOS DE DESECACIÓN.	85
FIG S4. PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS DE LAS CEPAS DEL CONSORCIO	86
TABLA S3 POBLACIÓN BACTERIANA EN SUSPENSIONES BACTERIANAS	87
TABLA S4. ADHESIÓN DE LAS CEPAS A LAS SEMILLAS SEMBRADAS EN VERMICULITA.	87
TABLA S5. COLONIZACIÓN DE LAS RIZÓSFERA DE PLANTAS DE MAÍZ CON LAS CEPAS DE LA MEZCLA BACTERIANA.	88
DISCUSIÓN	89
CONCLUSIONES	93
PERSPECTIVAS	94
BIBLIOGRAFIA	95

I. INTRODUCCIÓN

Las bacterias que forman parte de la rizósfera y tienen la capacidad de generar un efecto benéfico sobre el crecimiento de las plantas son definidas como Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR por sus siglas en inglés) (Vacheron *et al.* 2013). Se ha documentado que las PGPR pueden beneficiar a las plantas a través de diversos mecanismos que favorecen a la planta de forma directa e indirecta, de acuerdo a esta característica se han clasificado a los mecanismos de promoción de crecimiento vegetal en dos grupos (Fibach-Paldi, Burdman, and Okon 2012; Rojas-Tapias *et al.* 2012): los que realizan un efecto benéfico directo y los que realizan un efecto indirecto. Las bacterias con mecanismos de efecto benéfico directo, proporcionan nutrientes en formas absorbibles. Por ejemplo las rizobacterias fitoestimuladoras proporcionan nutrientes como fosfatos y nitrógeno, mediante procesos como la fijación biológica de nitrógeno o la solubilización de fosfatos (Saleem *et al.* 2007). También en este grupo se ubican a las bacterias capaces de producir fitohormonas como el ácido indol acético, giberilinas y citosinas y la enzima 1-aminociclopropano, 1 carboxilato (ACC) desaminasa (Kumar *et al.* 2016). Por otra parte, las PGPR que cuentan con mecanismos de efecto benéfico indirecto llevan a cabo el control biológico de microorganismos patógenos, mediante la producción de sustancias inhibitorias como enzimas líticas, antibióticos, bacteriocinas, compuestos orgánicos volátiles (VOCs) y sideróforos (do Carmo *et al.* 2011). Otro mecanismo indirecto ocurre a través de la estimulación de la resistencia sistémica inducida por rizobacterias (ISR por sus siglas en inglés) (Van Loon 2007); donde una bacteria rizosférica o endófito induce la respuesta de defensa de las plantas y estas a su vez responden con la síntesis de compuestos que limitan la colonización de un microorganismo patógeno. Los microorganismos benéficos que realizan la degradación de compuestos xenobióticos, que afectan el crecimiento de una planta, también podría significar un mecanismo indirecto que permite el éxito competitivo para el hospedero en ambientes contaminados adversos (Inostroza *et al.*, 2017).

En resumen, las PGPR benefician a su planta hospedera incrementando el crecimiento vegetal, la producción y el mantenimiento de la salud de la planta, mediante el empleo de diversos mecanismos de promoción del crecimiento celular (Malik and Sindhu 2011).

La interacción PGPR -planta es importante para la promoción del crecimiento vegetal y requiere que ocurra una adherencia adecuada a la semilla y una colonización efectiva de la bacteria a las raíces de la planta (Molina-Romero *et al.*, 2015). La capacidad de colonización de una bacteria PGPR y su supervivencia en la rizósfera en poblaciones adecuadas, es una característica imprescindible para considerarla como una PGPR exitosa (Kumar *et al.*, 2016).

Como parte de las actividades desarrolladas durante el doctorado se publicó una Revisión sobre los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal de las PGPR que se han estudiado y documentado, haciendo énfasis en las bacterias que han sido reportadas en América (Molina-Romero *et al.*, 2015). Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias,

aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biológicas* 17(1): 1-11], que se muestra a continuación:

Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico

Dalia Molina-Romero¹, María del Rocío Bustillos-Cristales¹, Osvaldo Rodríguez-Andrade¹, Yolanda Elizabeth Morales-García¹, Yair Santiago-Saenz¹, Miguel Castañeda-Lucio², Jesús Muñoz-Rojas¹✉

¹ Grupo Ecología y Supervivencia de Microorganismos, Laboratorio Ecología Molecular Microbiana, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM), Instituto de Ciencias BUAP, Edificio 103-E, Cuidad Universitaria, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), San Manuel, C.P. 72570, Puebla, Puebla México.

² Genética Molecular Microbiana, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CKM), Instituto de Ciencias BUAP, Edificio 103-E, Cuidad Universitaria, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), San Manuel, C.P. 72570, Puebla, Puebla México.

Resumen

Varias bacterias rizosféricas con potencial para estimular el crecimiento de las plantas se han aislado de diferentes lugares y regiones del mundo. Los mecanismos por los cuales estas bacterias tienen la capacidad de estimular el crecimiento de plantas incluyen la producción de fitohormonas, compuestos volátiles, compuestos antimicrobianos (producción de enzimas líticas, sideróforos), fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de fosfato y otros. Sin embargo, estos mecanismos dependen de la adherencia correcta de las bacterias a las raíces de las plantas y la colonización eficaz de la rizósfera. En diferentes lugares del continente americano se han reportado varios aislamientos bacterianos con potencial para estimular el crecimiento de las plantas y algunos de ellos han sido utilizados como formulaciones de inoculantes para incrementar el rendimiento de los cultivos. El objetivo de esta revisión fue mostrar una visión global de los mecanismos de promoción de crecimiento de plantas y el potencial agrobiotecnológico de algunas rizobacterias aisladas en América.

Palabras clave: bacterias tipo PGPR, inoculantes bacterianos, agrobiotecnología.

Mechanisms of plant growth stimulation by rhizobacteria, isolations from America and biotechnological potential

Abstract

Several rhizospheric bacteria with potential to stimulate the plant growth have been isolated from different places and regions of the world. The mechanisms by which rhizospheric bacteria have the ability to stimulate plant growth include phytohormone production, volatile compounds, antimicrobial compounds (lytic enzymes production, siderophores), biological nitrogen fixation, phosphate solubilization and others. However, these mechanisms depend on the right adhesion to plant roots and effective colonization from rhizosphere. On different places of American continent have been reported several bacterial isolations with potential to stimulate the growth of plants and some of them have been used as inoculant formulations to increment the culture yield. The objective of this revision was shown a global view of the mechanisms of plant growth promotion and the agrobiotechnological potential of some rhizobacteria isolated from Americas.

Key words: Plant growth promotion rhizobacteria, bacterial inoculants, Agrobiotechnology.

Introducción

Las bacterias rizosféricas desempeñan una función importante al establecer asociaciones con las plantas. En base al efecto que ejercen estos microorganismos sobre el crecimiento de las plantas, éstas pueden clasificarse en tres grupos: benéficas, neutras y patógenas (Beneduzi *et al.*, 2012). Kloeppler & Schroth (1978) introdujeron el término de rizobacterias en sus experimentos con rábanos, definiéndolo como la comunidad bacteriana que coloniza competitivamente las raíces de la planta, que estimulan su crecimiento y reducen la incidencia de las enfermedades. Posteriormente Kloeppler & Schroth (1981) designaron a este grupo bacteriano como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés: Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Jha *et al.*, 2012). Las PGPR mejoran el crecimiento, la producción y la salud de las plantas, empleando una amplia variedad de mecanismos moleculares (Malik & Sindhu, 2011). Las sustancias

que promueven el crecimiento vegetal son producidas por las bacterias rizosféricas y pueden influir directa o indirectamente sobre el metabolismo y fisiología de la planta (Saleem *et al.*, 2007; Bhattacharyya, 2012).

Las PGPR son bacterias que habitan la rizósfera, región del suelo que fue descrita por Hiltner en 1904 como el área del suelo influenciada por los exudados de la raíz, la rizósfera incluye el área del suelo unida a la raíz que se extiende a pocos milímetros de la superficie del sistema radicular, ésta se caracteriza por albergar una gran variedad de microorganismos en comparación con el resto del suelo (Do Carmo *et al.*, 2011). Los exudados rizosféricos incluyen aminoácidos, ácidos grasos, nucleótidos, ácidos orgánicos, fenoles, reguladores de crecimiento, esteroides, azúcares y vitaminas (Albareda *et al.*, 2006). Las rizobacterias compiten por estos metabolitos y por el sitio que ocupan sobre la raíz de la planta; siendo las uniones entre las células epidérmicas y el área donde emerge la raíz los sitios más poblados (Lugtenberg & Kamilova, 2009).

Los procesos de colonización y estimulación del crecimiento por parte de las rizobacterias podrían estar sujetos a mecanismos estrictos de reconocimiento del hospedero y procesos de señalización molecular entre la bacteria y la planta hospedera (Kamilova *et al.*, 2006). Las

✉ Jesús Muñoz Rojas, joymerre@yahoo.com.mx

Grupo Ecología y Supervivencia de Microorganismos, Laboratorio Ecología Molecular Microbiana, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias BUAP, Edificio 103-E, Cuidad Universitaria, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), San Manuel, C.P. 72570, Puebla, Puebla México. Teléfono: (222) 2295500 Ext. 7050

bacterias de tipo PGPR se han clasificado en grupos de acuerdo al efecto benéfico que ejercen sobre la planta (Fibach-Paldi *et al.*, 2012); el cual puede ser directo o indirecto (Ortiz-Castro *et al.*, 2009). Entre las PGPR que realizan un efecto directo se ubican las rizobacterias fitoestimuladoras (Malik & Sindhu, 2011), las que proporcionan nutrientes esenciales como las rizobacterias fijadoras de nitrógeno y las solubilizadoras de fosfatos (Saleem *et al.*, 2007). Las PGPR que ejercen un efecto indirecto afectan el crecimiento de fitopatógenos, lo que permite un mejor desarrollo de las plantas hospederas (Van Loon, 2007). Las PGPR pueden eliminar a los fitopatógenos a través de la producción de sustancias inhibitorias como enzimas líticas, antibióticos, sideróforos o bacteriocinas, en un mecanismo conocido como biocontrol (Do Carmo, 2011). Las bacterias tipo PGPR también contrarrestan a los patógenos a través del incremento de la respuesta de defensa de las plantas, en un mecanismo conocido como la estimulación de la resistencia sistémica inducida por rizobacterias (ISR por sus siglas en inglés: Induced Systemic Resistance produced by rhizobacteria) (Van Loon, 2007).

Aún cuando las PGPR se han clasificado en función de su mecanismo para promover el crecimiento de plantas, en realidad éstas ejercen su efecto benéfico empleando una combinación de mecanismos que permiten estimular el crecimiento y el mantenimiento de su salud (Babaloba, 2010). Para el buen desempeño de los mecanismos de estimu-

lación del crecimiento vegetal, la mayoría de las rizobacterias establecen tres pasos indispensables (Figura 1):

1. Atracción de la bacteria hacia la rizósfera de su hospedero, mediado por la quimiotaxis-específica bacteriana hacia exudados vegetales particulares, estos compuestos pueden servir como fuente de carbono y funcionar como moléculas de señalización (Albareda *et al.*, 2006).
2. Adhesión y colonización a la superficie de la raíz. Las bacterias deben tener la capacidad de adherirse a las semillas o raíces de plantas, para la posterior colonización; un proceso competitivo que es afectado por características genotípicas de la rizobacteria y la variedad de planta hospedera (Muñoz-Rojas *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2009). Además, se ha observado que la adhesión de algunas cepas bacterianas es sitio específica a la raíz, presentando un patrón de colonización particular en diferentes plantas (Bloemberg & Lugtenberg, 2001).
3. Funcionalidad de la simbiosis asociativa: implica un establecimiento efectivo de la relación microorganismo-planta, lo que podría favorecer: **I)** la modulación del balance hormonal de la planta mediante la producción de fitohormonas, compuestos orgánicos volátiles o por precursores del catabolismo de la planta. **II)** El mejoramiento en la nutrición de la planta mediante fijación biológica de nitrógeno y la solubilización de fosfatos (Jha *et al.*, 2012) y **III)** el mantenimiento de la salud de la planta (Van Loon, 2007; Bordiec *et al.*, 2011).

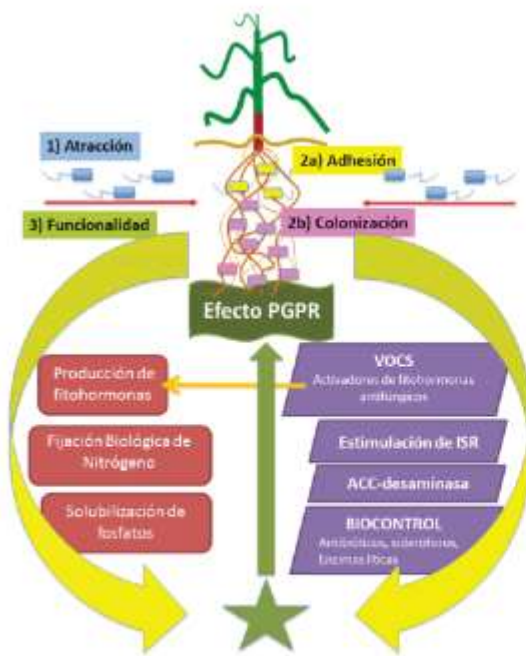


Figura 1. Atracción, adhesión y colonización bacteriana como determinantes para ejercer los mecanismos de estimulación de crecimiento vegetal.

Mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal

Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)

La FBN se define como la conversión de nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_4), compuesto químico del nitrógeno que puede ser utilizado por la planta, la transformación de N_2 a nitrógeno biodisponible se consigue mediante la enzima denominada nitrogenasa (Annan *et al.*, 2012). La FBN se lleva a cabo en bacterias asociadas a plantas y en bacterias de vida libre (figura 2). Las bacterias fijadoras de nitrógeno como *Allorhizobium* sp., *Azorhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Mesorhizobium* sp. y *Rhizobium* sp. (Fernández-Aunión *et al.*, 2010) forman nódulos en las raíces de plantas leguminosas como: soya, chícharo, cacahuete y alfalfa. El amonio generado por estas bacterias puede ser usado por las plantas hospederas como fuente de nitrógeno, dando a cambio la fuente de carbono requerida por las bacterias (Fernández-Aunión *et al.*, 2010). Los miembros del género *Frankia* también realizan la FBN en interacción simbiótica con plantas actinorrhizas (Santi *et al.*, 2013). Otros ejemplos de rizobacterias endófitas capaces de convertir nitrógeno atmosférico a la forma disponible para las plantas son: *Herbaspirillum* spp., *Azospirillum amazonense* y *Burkholderia tropica* (Suman *et al.*, 2008); sin embargo el aporte de estas bacterias vía FBN hacia la planta es mínimo (Muñoz-Rojas & Caballero-Mellado, 2003; Saravanan *et al.*, 2008).

Las bacterias de vida libre también son capaces de fijar

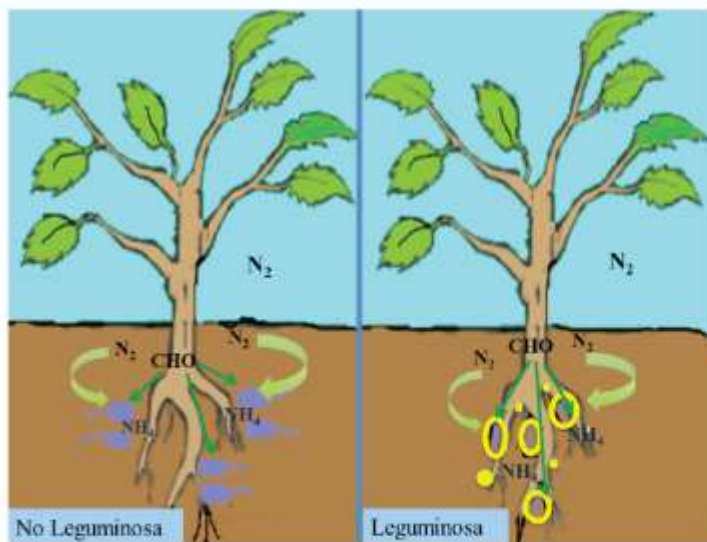


Figura 2. Esquema de la FBN en plantas no-leguminosas donde interaccionan bacterias de vida libre y plantas leguminosas donde interaccionan bacterias mutualistas. En el primer caso las bacterias solo se asocian a las raíces de las plantas y en el segundo caso las bacterias realizan una asociación íntima dentro de estructuras denominadas nódulos; donde las bacterias son protegidas del oxígeno y la nitrogenasa puede realizar su actividad con mayor eficiencia. En ambos casos las bacterias reciben fuente de carbono de las plantas (CHO) y a cambio ellas les proveen de nitrógeno combinado (NH_4) obtenido del proceso de la FBN.

nitrógeno atmosférico y algunos ejemplos incluyen a *Burkholderia unamae* (Caballero-Mellado et al., 2004; Caballero-Mellado et al., 2007), *Pseudomonas fluorescens* y algunas bacterias pertenecientes a *Beijerinckia* sp., *Bacillus* sp., *Azoarcus* sp., *Azotobacter* sp. (Guzmán et al., 2012), *Herbaspirillum* sp. y *Azospirillum* sp. (Fibach-Paldi et al., 2012), sin embargo; asociadas a plantas no parecen otorgar aportes significativos de nitrógeno y los mecanismos principales de crecimiento son independientes a esta vía. Por ejemplo *A. brasilense*, posee como mecanismo principal de promoción del crecimiento vegetal la producción de fitohormonas que estimulan el incremento del desarrollo de la raíz, impactando en el aumento de la toma de agua y minerales (Castro-Sowinski et al., 2007).

Biosolubilización de fosfatos

Otro nutriente importante que interviene en el crecimiento de la planta es el fósforo; que a pesar de encontrarse en grandes cantidades en el suelo, sólo es soluble en las formas monobásica: $H_2PO_4^{-1}$ y dibásica: HPO_4^{-2} , compuestos

disponibles para las plantas, aunque en campo comúnmente se mantienen en bajas concentraciones (Castagno et al., 2011). Algunas bacterias de tipo PGPR presentan la capacidad de solubilizar fosfatos a partir de compuestos inorgánicos u orgánicos, utilizando enzimas como: las fosfatasa no específicas, fitasas, fosfonatasas y C-P liasas (Lugtenberg & Kamilova, 2009). Un mecanismo alternativo para la obtención de este nutriente es la liberación de ácidos orgánicos, capaces de quelar el fósforo biodisponible en el suelo utilizando sus radicales hidroxilo y carboxilo (Vyas & Gulati 2009).

Las enzimas C-P liasas solubilizan fósforo a partir de componentes orgánicos del suelo, éstas cortan el enlace carbonofósforo de los compuestos organofosforados. La liberación de las formas solubles a partir del fósforo mineral, se realiza con la producción de ácidos orgánicos como el ácido glucónico o 2-cetoglucónico, la bioproducción de estos ácidos depende de la fuente de carbono disponible en la rizósfera (Ahemand et al., 2012). Ejemplos de bacterias de tipo PGPR con capacidad de solubilizar fosfa-

tos están dentro de los géneros *Achromobacter* sp., *Acinetobacter* sp., *Azospirillum* sp., *Burkholderia* sp., *Flavobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Microbacterium* sp., *Serratia*, *Beijerinckia* sp., así como las especies: *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus circulans*, *Cladosporium harbarum*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Rhizobium leguminosarum* (Rodríguez & Fraga 2006).

Producción de fitohormonas

La fitoestimulación es considerada el mecanismo más estudiado de las PGPR (Lugtenberg & Kamilova 2009); siendo las fitohormonas y algunos compuestos volátiles los responsables de este mecanismo promotor de crecimiento. Algunos de los microorganismos del suelo tienen la capacidad de producir fitohormonas que son responsables de incrementar el sistema radicular de la planta y el follaje (Bal et al., 2012). Las fitohormonas son moléculas orgánicas que regulan la expresión de genes implicados en el crecimiento y desarrollo vegetal, estos compuestos son sintetizados en diferentes estructuras de la planta y su acción varía en función de los cambios ambientales que modifican la expresión génica del organismo (Aguilar-Piedras et al., 2008). Recientemente se ha establecido que las fitohormonas también están implicadas en las vías de represión catabólica y regulación de la formación de biopelículas (Bhattacharyya 2012).

Las PGPR producen más de un tipo de fitohormonas como por ejemplo: las auxinas, citocininas, etileno, giberelinas y ácido abscísico (ABA) (Vilchez & Manzanera 2011). Estas moléculas exhiben diferentes efectos específicos sobre la fisiología vegetal, como incrementar el volumen radicular, aumentar la tasa de respiración de la raíz de la planta hospedera y el flujo de protones en la membrana de la raíz; en consecuencia se aumenta la absorción de nutrientes y minerales solubles (Fibach-Paldi et al., 2012).

El ácido-indol-3-acético (IAA) es la auxina más estudiada, producida por las rizobacterias, esta fitohormona está implicada en el desarrollo de la raíz e incrementa la división celular

(Ortiz-Castro *et al.*, 2009); es sintetizada por diversas vías metabólicas en función de la bacteria implicada a partir del triptófano también presente en los exudados de las raíces (Camelo *et al.*, 2011). Entre las vías de biosíntesis bacterianas más conocidas están la del ácido indol-3-pirúvico (IPyA), la indol-3-acetonitrilo (IAN), la triptamina (TAM) y la del indol-3-acetamida (IAM). Para vegetales existe una vía independiente de triptófano que aún no se ha descrito en bacterias (Aguilar-Piedras *et al.*, 2008). Entre las PGPR reportadas con capacidad de producir AIA se ubican a *G. diazotrophicus* (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1993), *Aeromonas veronii*, *Alcaligenes piechaudii*, *A. brasilense*, *Comamonas acidovorans*, *Enterobacter cloacae*, *Rhizobium leguminosarum* y *Bradyrhizobium* sp. (Malik & Sindhu, 2011).

Las citocininas producidas por las PGPR favorecen la división celular en la raíz, la elongación, diferenciación celular y el incremento del área de la raíz mediante la formación de raíces adventicias, además la formación de hojas (Ortiz-Castro *et al.*, 2009). Ejemplos de estas rizobacterias incluyen a *Arthrobacter giacomelloi*, *Azospirillum brasilense*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Bacillus licheniformis*, *Paenibacillus polymyxa* en trigo; *Pseudomonas fluorescens* en soya y *Rhizobium leguminosarum* en lechuga (Vacheron *et al.*, 2013).

Las giberelinas son moléculas complejas con grupos di-terpenos tetracarboxílicos. Se han caracterizado 136 giberelinas distintas, entre las que están las AG1, AG3 y AG4 (Kang *et al.*, 2014). Estas fitohormonas influyen sobre la germinación mediante la interrupción del periodo de latencia de las semillas, la elongación del tallo, la floración, el desarrollo del fruto y la altura de la planta (Camelo *et al.*, 2011). *G. diazotrophicus*, *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *Bacillus pumilus*, *B. licheniformis*, *Herbaspirillum seropedicae* y *R. phaseoli* son especies bacterianas capaces de producir estos compuestos (Babaloba 2010).

Mecanismos indirectos de promoción del crecimiento vegetal

Mecanismos de biocontrol (Antagonismo)

Se han empleado microorganismos para control biológico de enfermedades en plantas, algunas PGPR (agentes de biocontrol) eliminan de forma natural a los fitopatógenos (bacterias, hongos, maleza e insectos); mediante la producción de algunos metabolitos secundarios que son excretados localmente o cerca de la superficie de la planta (Bloembergen & Lugtenberg, 2001); es importante mencionar que estas moléculas son biodegradables y no se necesitan en cantidades elevadas, a diferencia de los agroquímicos que son resistentes a la degradación por microorganismos y se aplican en grandes cantidades a los cultivos agrícolas para mantener la salud de las plantas. Se han caracterizado varias clases de moléculas producidas por bacterias antagonicas Gram negativas capaces de ejercer actividad de biocontrol en contra de patógenos causantes de enfermedades de la raíz; dentro de éstas se encuentran: el ácido cianídrico (compuesto volátil), el ácido fenazina-1-carboxílico, la pioletorina, la pirrolnitrina, los lipopéptidos cíclicos y el

diacetilfloroglucinol (DAPG) (Couillerot *et al.*, 2013), este antibiótico causa daño a la membrana celular de patógenos fúngicos como *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora* sp. (Vilchez & Manzanera 2011).

Los tipos de sustancias inhibitorias producidas por las PGPR que más se han reportado se mencionan a continuación:

Antibióticos

Este mecanismo se basa en la secreción de moléculas de amplio espectro capaces de eliminar o disminuir el crecimiento de algunos patógenos de plantas (Bal *et al.*, 2012). Los mecanismos de acción de estos metabolitos incluyen: la inhibición de síntesis de pared celular, la desestabilización estructural de la membrana celular y la inhibición de la formación del complejo de iniciación de la traducción de los fitopatógenos (Beneduzi *et al.*, 2012). Ejemplos de rizobacterias productoras de antibióticos corresponden a los géneros *Burkholderia* sp. (Tenorio-Salgado *et al.*, 2013), *Streptomyces venezuelae* (Morales-García *et al.*, 2007; Kannan & Prakash *et al.*, 2011).

Sideróforos

Estos compuestos son péptidos de bajo peso molecular con grupos funcionales que tienen alta afinidad y capacidad de coordinar iones Fe^{3+} (Stearns *et al.*, 2012). Está ampliamente documentada la participación del hierro en diferentes procesos biológicos vitales para las células como cofactor de una gran variedad de reacciones enzimáticas (Tenorio *et al.*, 2012) por lo que la limitación de este macronutriente es letal para los microorganismos. Los sideróforos se han clasificado en: carboxilatos, hidroxamatos, fenol cateoles y pioverdinas, esta clasificación se basa en las características estructurales, específicamente en los grupos funciones que coordinan el hierro y los tipos de receptores (Rajkumar *et al.*, 2012). El mecanismo de acción de los sideróforos inicia con la formación de un complejo sideróforo- Fe^{3+} , unido posteriormente a receptores de membrana dependientes de la limitación por hierro (Vacheron *et al.*, 2013), posteriormente el hierro es interiorizado y reducido en el citoplasma bacteriano al ión activo Fe^{2+} (Beneduzi *et al.*, 2012).

Las PGPR con capacidad de producir sideróforos adquieren ventajas competitivas en la colonización de la raíz, competencia por el nicho ecológico e inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos por la baja concentración de Fe^{3+} disponible en suelos como ocurre con *B. altitudinis* que antagoniza eficientemente a *Thanatephorus cucumeris* (Sunar *et al.*, 2013). Otras bacterias productoras de sideróforos son *Burkholderia gladioli* (Marin-Cevada *et al.*, 2012), *R. meliloti*, *B. tropica* (Tenorio-Salgado *et al.*, 2013) y *P. aeruginosa* (Vyas & Gulati, 2009).

Enzimas liticas

Estas enzimas son capaces de destruir la pared celular del hongo, entre las que se identificaron quitinasas (Zhu, 2007), celulasas, beta-1,3 glucanasas, proteasas y lipasas (Lugtenberg & Kamilova, 2009). Algunas rizobacterias

productoras de estas enzimas son *Bacillus altitudinis*, *B. amyloliquefaciens* (Sunar et al., 2013).

Metabolitos antifúngicos

La mayoría de las PGPR producen: fenazinas, pyrrolnitrina, 2,4-diacetilfloroglucinol, pyoluteorina, visconinamida y tensinas; además de enzimas como peroxidasa, oxidasa polifenol y la fenilalanina amonio-liasa cuya función de estos compuestos en la defensa contra los fitopatógenos fúngicos (Babaloba 2010). Entre los géneros con capacidad de biocontrol contra hongos se han identificado: *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Paenibacillus* sp., *Pseudomonas* sp. y *Streptomyces* sp.; estas rizobacterias tienen la capacidad de suprimir patógenos como el virus del mote del tomate, el virus necrosante del tabaco, *Rhizoctonia bataticola*, *Myzus persicae*, *Fusarium avenaceum* entre otros fitopatógenos (Babaloba 2010).

Controladores de estrés, regulación de los niveles de etileno en la planta.

Las rizobacterias con capacidad de producir la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa, facilitan y ayudan sustancialmente al crecimiento y desarrollo de la planta bajo condiciones de estrés mediante la disminución de los niveles de etileno (hormona) (Shen 2012; Caballero-Mellado 2007). Cuando la planta se enfrenta a altas concentraciones de etileno, esta sufre desfoliación, inhibición de la elongación de las células, senescencia y otros procesos celulares que podría mermar el desarrollo de la planta (Stearns et al., 2012; Vacheron et al., 2013). Estas bacterias utilizan el 1-aminociclopropano-1-carboxilato (precursor del etileno) y lo metabolizan en alfa-cetobutirato y amoniaco. Entre los géneros donde se ha evidenciado la producción de esta enzima encontramos a *Achromobacter* sp., *Alcaligenes* sp., *Azospirillum* sp., *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp. (Onofre-Lemus et al., 2009), *Rhizobium*, *Rhodococcus*; así como *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Methylobacterium fujisawaense*, *Pseudomonas putida* y *Sinorhizobium meliloti* (Jorquera et al., 2012). Esta reacción metabólica disminuye el estrés en la planta generado por altas concentraciones de esta hormona, afectando a algunas bacterias fitopatógenas; además proporciona resistencia a hidrocarburos poliaromáticos, desecación, salinidad y metales pesados como níquel y calcio (Bal et al., 2012).

Resistencia sistémica inducida (ISR)

La interacción de algunas PGPR con su planta hospedera puede reducir el número de enfermedades de la planta o la severidad de la sintomatología de la infección generada por algunas bacterias, hongos, virus, nemátodos y algunos insectos patógenos (Poupin et al., 2013). Esto ocurre porque algunas de las rizobacterias desencadenan en las plantas un proceso de capacidad defensiva por periodos prolongados ("inmunidad"), conocido como resistencia sistémica inducida (ISR, por sus siglas en Inglés) (Lucas et al., 2013). La respuesta ISR comparte muchas propiedades con la respuesta inmune innata, este proceso depende de

la señalización del ácido jasmónico y etileno en la planta. La acumulación de estas moléculas coordinan a nivel sistémico la activación y el mejoramiento de la capacidad de defensa (Bordiec et al., 2011); mediante mecanismos como: el reforzamiento de la pared celular, la producción de fitoalexinas anti-microbianas, peroxidasa, quitinasa, β -1-3 glucanasa, fenilalanina amonio liasa, proteínas relacionadas con la patogénesis y producción de biosurfactantes (Sunar et al., 2013).

Algunos organelos y moléculas bacterianas inducen la respuesta ISR, tales como: lipopolisacáridos (LPS), flagelo, ácido salicílico, sideróforos, lipopéptidos cíclicos, el factor antifúngico Phl, molécula (AHLs) y los degradadores de compuestos volátiles producidos por *Bacillus subtilis* rompen la acetoina y 2,3-butaneidol. A diferencia con otros mecanismos de biocontrol, para desencadenar el mecanismo ISR no se requiere que la cepa colonice la raíz de la planta de forma extensiva, como ha sido reportado para *Bacillus altitudinis*, *B. cereus*, *B. subtilis* (Poupin et al., 2013). Otros ejemplos de rizobacterias capaces de promover el ISR en plantas son: *B. amyloliquefaciens*, *B. pasteurii*, *B. pumila*, *B. mycoide*, *B. sphaericus*, *Burkholderia phytofirmans*, *Rhizobium leguminosarum*: *P. putida* 89B-27 y *Serratia marcescens* (Bhattacharyya 2012).

Compuestos orgánicos volátiles (VOCs)

Estos compuestos se han identificado como moléculas volátiles de bajo peso molecular (VOCs) menor o igual a 300g/mol; dentro de este grupo de moléculas se han encontrado aldehidos, alcoholes, cetonas, hidrocarburos, indoles, derivados de ácidos grasos, terpenos y jasmونات (Van Loon 2007). Aunque algunos VOCs actúan de forma directa como fitohormonas, la mayoría estimula de forma indirecta a la promoción del crecimiento vegetal. Los VOCs más representativos son la acetoina y el 2,3-butanodiol producidos por *Enterobacter cloacae* JM22 (Farag et al., 2013). Se ha propuesto que la biosíntesis activa de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) es un fenómeno cepa-específico (Park et al., 2013).

B. subtilis GB03 produce VOCs que pueden activar las vías de producción de fitohormonas como auxinas, giberelinas, citocininas, ácido salicílico y brasinosteroides, promoviendo el desarrollo de *Arabidopsis* sp. mediante la acumulación de auxinas en los sitios primordiales de la raíz; además de modificar la pared celular que permite el alargamiento de las células radiculares (Zhang, 2007).

Los VOCs producidos por las rizobacterias pueden actuar como moléculas señal que median la interacción microorganismo-planta; cuando son producidos en suficiente concentración aumentan la respuesta inmunitaria, estimulando específicamente la resistencia sistémica inducida (ISR); regulan el crecimiento, morfogénesis de la planta, antibiosis y biocontrol de fitopatógenos (Farag et al., 2013). En 2009 Ortiz-Castro reportó que los VOCs amonio, butirrolactonas, HCN y ácido fenazina-1-carboxílico, presentan actividad *in vivo* en diferentes especies de hongos, inhiben el crecimiento del micelio y promueven la reducción de la esporulación. *B. subtilis* GB03 y *B. amyloliquefaciens*

IN937a, producen acetoina y 2,3-butanediol, esta última PGPR estimula la resistencia sistémica inducida en contra del patógeno *Erwinia carotovora* mediante señalización independiente de etileno; a diferencia de *B. subtilis* que estimula el ISR vía señalización dependiente de etileno en *Arabidopsis* sp. (Ryu *et al.*, 2004). En 2013 Park evidenció la capacidad de *P. polymyxa* E681 de producir hexadecano (VOCs de cadena larga) que estimula fuertemente la ISR de *Arabidopsis* sp. en contra de *Pseudomonas syringae* a comparación de la estimulación generada por *B. subtilis* en contra de este mismo fitopatógeno. Zhang en 2009 reportó que la producción de VOC de *B. subtilis* GB03 mejora la asimilación de hierro y la fotosíntesis de *Arabidopsis* sp.; estimulando la síntesis del factor transcripcional inducido por deficiencia de Fe (ftl-2), incrementando la producción de la enzima reductasa férrica y del transportador de Fe IRT1; además de acidificar el medio, lo que incrementa la disponibilidad de este macronutriente. Estos efectos fueron observados en la planta silvestre y en la mutante ftl-2 complementada.

Otra función recientemente propuesta para los VOCs (producidos por las PGPR) es aumentar la resistencia al estrés abiótico de las plantas bajo condiciones de salinidad, sequía y metales pesados (Farang *et al.*, 2013).

Aislamientos de bacterias benéficas en América

En las tablas 1a y 1b se organizan las cepas PGPR aisladas en América, en la mayoría de estos trabajos se ha sugerido el mecanismo probable de acción que las rizobacterias ejercen sobre su planta hospedera, así como los países donde fueron localizadas estas PGPR. Esta tabla ofrece un panorama global del conocimiento generado en América, además muestra varios trabajos que han contribuido a fortalecer y elucidar el conocimiento de los diversos

mecanismos de promoción del crecimiento vegetal que emplean estas rizobacterias.

Azospirillum sp. y *Pseudomonas* sp. han sido aisladas de una gran variedad de cultivos en diversos países americanos, obteniendo resultados similares a los reportados por otras investigaciones desarrolladas en el resto del mundo, en referencia a la capacidad de promover el crecimiento de plantas. Diversas cepas del género *Azospirillum* sp. aisladas en América potencian el crecimiento de maíz, soja, lechuga, la gramínea Eulalia, algodón, pimentón, arbustos de manglares y mangle rojo. En naciones como Colombia, *Azospirillum* sp. Lag10 aumentó el crecimiento de algodón, sugiriendo que el mecanismo empleado por esta PGPR es la producción de AIA (Guzmán *et al.*, 2012); en Río de Janeiro, Brasil, este género fue aislado del mangle rojo así como de Eulalia (Do Carmo *et al.*, 2011). En Tachira, Venezuela se aislaron varias cepas del género *Azospirillum* sp. cepa 23 a partir de pimentón y maíz, estas incrementaron el crecimiento de estos vegetales probablemente mediante la producción de fitohormonas y sideróforos. (Reyes *et al.*, 2008). En Plata, Argentina *Azospirillum brasilense* Sp245 promovió el crecimiento de lechugas en comparación a lechugas no inoculadas, sugiriendo mecanismos como: producción de auxinas, giberelinas, solubilización de fosfatos y de sideróforos (Fasciglione *et al.*, 2012).

Pseudomonas fluorescens ABE66285 y *Pseudomonas* sp. HM011621 fueron aisladas de un arbusto conocido como Gobernadora en Chile, en este estudio se sugiere la producción de ACC desaminasa y solubilización de fosfatos en ambas rizobacterias (Jorquera *et al.*, 2012). *P. fluorescens* M25 se aisló de raíces de una leguminosa forrajera en Río Salado, Argentina, esta rizobacteria es capaz de solubilizar fosfatos (Castagno *et al.*, 2011). En Río de Janeiro, Brasil fue aislada *Pseudomonas* sp. Avi 5 del mangle rojo y mangle preto (Do Carmo *et al.*, 2011), mostrando la versatilidad de

Tabla 1a. Ejemplos de bacterias tipo PGPR aisladas en Norteamérica. SGAC: sitio de geográfico de aislamiento de la cepa; PS: producción de sideróforos; SF: solubilización de fosfatos; AIA: producción de ácido indol acético; B: Biocontrol; DAPG: 2,4 diacetylphloroglucinol; ACC: enzima 1-aminoácilopropano-1-carboxilato desaminasa; ISR: respuesta sistémica inducida por rizobacterias; AN: antimicrobianos; FBN: fijación biológica de nitrógeno.

PGPR aislada	Mecanismo	Planta	SGAC	Referencia
<i>P. aeruginosa</i> A11	PS, HCN y SF	Escoba amarga	NY-EUA	Kumar <i>et al.</i> , 2013
<i>A. brasilense</i> UAP-154 y CFN-535	AIA	Maíz	México	Dobbelaere <i>et al.</i> , 2001
<i>B. subtilis</i> DN, MZ y BH	ACCd	Guayaba	Gto-México	Gómez Luna <i>et al.</i> , 2012
<i>B. tropica</i> MTa 293	VOC, FBN, PS y SF	Maíz	Oax-México	Tenorio <i>et al.</i> , 2012
<i>Enterobacter</i> sp. UAPSO3001	Desconocido	Maíz	Tlax-México	Morales-García <i>et al.</i> , 2011
<i>B. unamae</i> MTI-641 [†]	FBN, AACd	Tomate	Mor-México	Caballero-Mellado <i>et al.</i> , 2004
<i>B. tropica</i> MCu-831	FBN	Maíz	Mor-México	Reis <i>et al.</i> , 2004
<i>G. diazotrophicus</i> UAP-C105	FBN, AIA	Cafeto	Pue-México	Jiménez-Salgado <i>et al.</i> , 1997
<i>G. johannae</i> CFN-CF55 [†]	Desconocido	Cafeto	Chis-México	Fuentes-Ramírez <i>et al.</i> , 2001
<i>B. subtilis</i>	B	Papa	Gto-México	Jiménez-Delgado <i>et al.</i> , 2001
<i>B. vietnamiensis</i> MMI-324	FBN	Maíz	Mor-México	Estrada-de los Santos <i>et al.</i> , 2001

Tabla 1b. Ejemplos de bacterias tipo PGPR aisladas en Sudamérica. SGAC: sitio de geográfico de aislamiento de la cepa. PS: producción de sideróforos, SF: solubilización de fosfatos, AIA: producción de ácido indol acético, B: Biocontrol, DAPG: 2,4 diacetylphloroglucinol, ACC: enzima 1-aminoácido propano-1-carboxylato desaminasa, ISR: respuesta sistémica inducida por rizobacterias, AN: antimicrobianos, FBN: fijación biológica de nitrógeno.

PGPR aislada	Mecanismo	Planta	SGAC	Referencia
<i>Azospirillum</i> sp. SRGM2	SF	Pasto de Guinea	Colombia	Cárdenas-Caro et al., 2014
<i>B. diazoefficiens</i> CPAC	FBN, AIA	Soja, Maíz	Londrina-Brasil	Marks et al., 2013
<i>Azotobacter</i> sp. MFB1 y MFS.	FBN y SF	Maíz	Táchira-Venezuela	Valery & Reyes et al., 2013
<i>Azotobacter</i> sp. NAT 13	FBN	Algodón	Tolima-Colombia	Guzmán et al., 2012
<i>P. fluorescens</i> ABE66285	ACC d y SF	Gobernadora	Chile	Jorquera et al., 2012
<i>Bacillus</i> sp. LMA5	AIA, SF	Cactus	Brasil	Kavamura et al., 2013
<i>Pseudomonas</i> sp. Avi 5	FBN, SF y AIA	mangle rojo y preto	RJ-Brasil	Do Carmo. et al., 2011
<i>Pantoea eucalypti</i> M91	SF	Gramínea forrajera	Río Sal- Argentina	Castagno et al., 2011
<i>B. amyloliquefaciens</i> Bac3M6	AIA, SF	Papa	M. andinas- Perú	Calvo. et al., 2010
<i>Azospirillum</i> sp. Cepa 23	PS, FBN	Frijol	Tachira-Venezuela	Reyes et al., 2008
<i>B. silvatlantica</i> PPCR-7	Desconocida	Caña de azúcar	RJ-Brasil	Perin et al., 2005
<i>A. doebereineriae</i> GSF71 ¹	FBN	pasto tropical	Brasil	Eckert et al., 2001

cepas del género *Pseudomonas* para interactuar con una gran variedad de vegetales, haciendo a estas candidatas para ser usadas en agrobiotecnología, debido a su adaptación efectiva.

El género *Burkholderia* ha sido aislado de una gran diversidad de plantas de importancia agrícola como el caso de *Burkholderia silvatlantica* SRMrh-20¹ aislada de caña de azúcar y maíz en Río de Janeiro Brasil (Perin et al., 2005). En Morelos, México se aisló a *Burkholderia unamae* MTI-641¹ de plantas de tomate, en este estudio se evidenció su capacidad de producir ACC desaminasa y fijación biológica de nitrógeno (Caballero-Mellado et al., 2004). *Burkholderia tropica* Ppe8T fue aislada de caña de azúcar en Brasil y en México del teosinte, esta rizobacteria es capaz de realizar fijación biológica de nitrógeno (Reis et al., 2004). *B. vietnamiensis* TVV75T fue aislada de las raíces de maíz y café, donde se observó su capacidad de fijar nitrógeno, los aislamientos se realizaron en algunos estados de México como Morelos, Chiapas y Oaxaca (Estrada-de los Santos et al., 2001).

Potencialidades de bacterias benéficas como inoculantes para la agricultura

Por sus características metabólicas versátiles, las rizobacterias poseen un potencial biotecnológico para la formulación de inoculantes; entre los que destacamos a los biofertilizantes (bacterias fijadoras de nitrógeno) (Saravanan et al., 2008), fitoestimulantes (bacterias productoras de hormonas), agentes de biocontrol (bacterias que eliminan patógenos) (Marín-Cevada 2012; Ortiz-Castro et al., 2009), entre otras. Ejemplo de lo anterior es el modelo bacteriano de *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas* sp.; cuyos mecanismos de acción han sido ampliamente estudiados (Castro-Sowinski et al., 2007). Con los resultados generados a partir de estos

estudios, se han formulado y comercializado inoculantes (tipo biofertilizantes) con *A. brasilense* ó *A. lipoferum*; estos inoculantes se han aplicado en cientos de miles de hectáreas principalmente en Latinoamérica (Caballero-Mellado 2006; Fuentes-Ramírez & Caballero-Mellado 2005, Atieno et al., 2012; Fasciglioni et al., 2012). El empleo a gran escala de los biofertilizantes resulta atractivo a la práctica agrícola por el incremento en la producción de cultivos; además de ser una opción para cubrir la gran demanda actual de alimentos, así como por la reducción del uso de fertilizantes químicos y agroquímicos, impactando de forma directa en la reducción de la contaminación de los suelos agrícolas y mantos acuíferos (Rumjanek et al., 1993; Guzmán et al., 2012).

En México se han generado empresas dedicadas a producir y comercializar biofertilizantes, entre las que ubicamos a Biofábrica Siglo XXI que ha desarrollado productos como Azofer, inoculante formulado a base de *A. brasilense*; Rhizofer, formulado con *Rhizobium etli*, la producción de los inoculantes a nivel industrial surgió a partir de un licenciamiento tecnológico celebrado con el Centro de Ciencias Genómicas UNAM (<http://www.biofabrica.com.mx/about.html>). Biosustenta es otra empresa mexicana dedicada al desarrollo y producción de insumos biológicos como el inoculante Ferbilq, formulado a base de *A. brasilense* y *Glomus intrarradices*; Endomaz, biofertilizante hecho a base de *A. brasilense* (<http://cosustenta.com/catalogo.html>). Fertilizantes Mexicanos es otra empresa que comercializa biofertilizantes formulados con bacterias fijadoras de nitrógeno (Azoton AA Plus); Biomtrics es formulado con bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos, otros de sus productos son Bioespiril y Raizinn Bio (<http://biofertilizantes.mx/index.html>). También Bio Orgánica Mexicana comercializa biofertilizantes como: Ultralite AZO (<http://www.bio-organica.com.mx>). Todas las empresas

antes mencionadas ofrecen al agricultor una alternativa ecológica para incrementar la producción de sus cultivos, además de un impacto favorable a su economía, por los costos menores de estos productos en comparación con los fertilizantes químicos.

Argentina es otro de los países que ha desarrollado agrobiotecnología desde hace 50 años, empleando a las PGPR aisladas de este país para la formulación de inoculantes bacterianos, estas formulaciones se desarrollaron para mejorar el crecimiento y aumentar la productividad de plantas leguminosas y cereales de importancia agrícola de esta región, dentro de las leguminosas encontramos a soja, alfalfa, tréboles blanco y rojo, haba, cacahuete, chicharo, lentejas, frijol, garbanzos y cereales como maíz y trigo. Dentro de las empresas con más trayectoria en esta área biotecnológica ubicamos a NITRASOIL ARGENTINA S. A. que ha desarrollado un inoculante que contiene bacterias del género *Azospirillum* sp. cepa AZ39, recomendada por el INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) por ser considerada la mejor entre las disponibles hasta el momento (<http://www.nitrasoil.com.ar>). La Empresa Rizobacter Argentina S. A. Microbiología agrícola (<http://www.viatural.com.ar>) cuenta con una variedad de productos cuya formulación está dirigida a soja, maíz y trigo. Las bacterias que emplean para el desarrollo de estos inoculantes son *Pseudomonas fluorescens*, *Bradyrhizobium* sp., *Mesorhizobium cicerii*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* biovar trifoli y *Bradyrhizobium japonicum*. La firma Nitrasoil S. A. se dedica a la formulación y comercialización de fertilizantes e inoculantes biológicos para el sector agrícola, también FPC Argentina S.A. (<http://www.fpcinoculantes.com.ar>); (<http://geadecolon.com.ar>) GEA: Graneros y Elevadores Argentinos de Colon Soc. Coop. Ltda y bionet (<http://www.bionet.com.ar/inoculantes-bionet-soja-premium.php>). Estas empresas son las más representativas de América que han aplicado las características metabólicas versátiles de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal aisladas de este continente para la formulación de inoculantes bacterianos.

Conclusiones

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal poseen mecanismos moleculares que impactan de forma favorable al crecimiento, la producción y la salud de las plantas con las que interactúan. Las PGPR promueven el crecimiento vegetal de forma directa e indirecta. El efecto es considerado como directo, cuando el microorganismo aporta nutrientes esenciales a la planta o fitohormonas. El efecto indirecto se establece cuando las rizobacterias que protegen a la planta de patógenos mediante la activación de la ISR o cuando efectúan el biocontrol. La gran mayoría de las PGPR cuentan con más de un mecanismo de promoción del crecimiento vegetal ejerciendo el efecto benéfico tanto de forma directa como indirecta sobre la planta. Ejemplo de lo anterior son algunas de las rizobacterias aisladas en América. La versatilidad metabólica de las PGPR aisladas de diversas regiones del mundo tienen potencial agrobiotecnológico para la

producción de Biofertilizantes, ejemplo fehaciente son las empresas mexicanas y argentinas dedicadas a la producción y comercialización de esta aplicación biotecnológica. Los inoculantes son una alternativa en favor de la agricultura sustentable, que incrementan el rendimiento, disminuyen la contaminación y los costos de producción en la práctica agrícola. Sin embargo, aún falta conocimiento relacionado con la interacción microorganismo-planta y elucidar como ocurren varios de los mecanismos de interacción las bacterias asociadas a las plantas, en especial es de particular interés conocer cuáles son los mecanismos de promoción de crecimiento que las bacterias expresan asociados a plantas y bajo qué condiciones ambientales lo llevan a cabo. Los esfuerzos de la aplicación de las bacterias PGPR para explotar sus beneficios potenciales son aún muy pocos en el mundo. En América a pesar de que existen empresas que fabrican inoculantes con bacterias benéficas, aún no existe una cultura de aplicación de los microorganismos PGPR y las formulaciones comerciales tendrán que ser más eficientes para convencer a los agricultores de que su uso es imprescindible para potenciar el crecimiento de plantas.

Agradecimientos

A CONACYT (000000000156576), DITCo2015, VIEP15-I y PRODEP por el soporte para el desarrollo de esta investigación. Dalia Molina-Romero y Osvaldo Rodríguez-Andrade son becarios CONACYT por lo que adicionalmente agradecemos a esta institución.

Referencias

- Aguilar-Piedras J, Xique-Vásquez M, García S, Baca BE** (2008) Producción del ácido indol-3-acético en *Azospirillum*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 50: 29-37.
- Ahemand M, Khan M** (2012) Alleviation of fungicide-induced phytotoxicity in greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] using fungicide-tolerant and plant growth promoting *Pseudomonas* strain. *Saudi J. Biol. Sci.* 19: 451-59.
- Albareda M, Dardanelli MS, Sousa C, Megías M, Temprano F, Rodríguez-Navarro D** (2006) Factors affecting the attachment of rhizospheric bacteria to bean and soybean roots. *FEMS Microbiol. Lett.* 259: 67-73.
- Annan H, Golding A, Zhao Y, Dong Z** (2012) Choice of hydrogen uptake (Hup) status in legume-rhizobia symbioses. *Ecol. Evol.* 2: 2285-90.
- Atieno M, Herrmann L, Okalebo R, Lesueur D** (2012) Efficiency of different formulations of *Bradyrhizobium japonicum* and effect of co-inoculation of *Bacillus subtilis* with two different strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 2541-50.
- Babaloba OO** (2010) Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol. Lett.* 32: 1559-70.
- Bal HB, Das S, Dangar TK, Adhya TK** (2012) ACC deaminase and IAA producing growth promoting bacteria from the rhizosphere soil of tropical rice plants. *J. Basic. Microbiol.* 53: 972-84.

- Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia LMP** (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet. Mol. Biol.* 35: 1044-51.
- Bhattacharyya PN, Jha DK** (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1327-50.
- Bloemberg GV, Lugtenberg BJ** (2001) Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 343-50.
- Bordiec S, Paquis S, Lacroix H, Dhondt S, Alt Barka E, Kauffmann S, Jeandet P, Mazeyrat-Gourbeyre F, Clement C, Baillieu F, Dorey S** (2011) Comparative analysis of defence responses induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN and the non-host bacterium *Pseudomonas syringae* pv. pisi in grapevine cell suspensions. *J Exp Bot* 62: 595-603
- Caballero-Mellado J** (2006) Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 48: 154-61.
- Caballero-Mellado J, Onofre-Lemus J, Estrada-de los Santos P, Martínez-Aguilar L** (2007) The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5308-19.
- Caballero-Mellado J, Martínez-Aguilar L, Paredes-Valdez G, Estrada-de los Santos P** (2004) *Burkholderia unamae* sp. nov., an N_2 -fixing rhizospheric and endophytic species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1165-72.
- Calvo P, Ormeño-Orillo E, Martínez-Romero E, Zuñiga D** (2010) Characterization of *Bacillus* isolates of potato rhizosphere from Andean soils of Peru and their potential PGPR characteristics. *Braz. J. Microbiol.* 41: 899-906.
- Camelo M, Vera SP, Bonilla R** (2011) Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Rev. Corpoica-Ciencia y Tecnol. Agropecuaria* 12: 159-66.
- Cárdenas-Caro DM, Garrido-Rubiano MF; Roncallo-Fandiño BA, Bonilla-Buitrago RR** (2014) Inoculation with *Azospirillum* spp and *Enterobacter agglomerans* in Guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.) in the Cesar Department (Colombia). *Rev. Fac. Nat. Agr. Medellín* 67: 7271-80.
- Castagno LN, Estrella MJ, Sannazzaro AI, Grassano A, Ruiz OA** (2011) Phosphate-solubilization mechanism and *in vitro* plant growth promotion activity mediated by *Pantoea eucalypti* isolated from *Lotus tenuis* rhizosphere in the Salado River Basin (Argentina). *J Appl. Microbiol.* 110: 1151-65.
- Castro-Sowinski S, Herschkovitz Y, Okon Y, Jurkevitch E** (2007) Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 276: 1-11.
- Couillerot O, Ramirez-Trujillo A, Walker V, von Felten A, Jansa J, et al.** (2013) Comparison of prominent *Azospirillum* strains in *Azospirillum-Pseudomonas-Glomus* consortia for promotion of maize growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 4639-49.
- Do Carmo FL, dos Santos HF, Martins EF, Van Elsas JD, Rosado AS, Peixoto RS** (2011) Bacterial structure and characterization of plant growth promoting and oil degrading bacteria from the rhizospheres of mangrove plants. *J. Microbiol.* 49: 535-43.
- Drogue B, Doré H, Borland S, Wisniewski-Dyé F, Prigent-Combaret C** (2012) Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants?. *Res. Microbiol.* 163: 500-10.
- Eckert B, Weber OB, Kirchhof G, Halbritter A, Stoffels M, Hartmann A** (2001) *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C_4 -grass *Miscanthus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 17-26.
- Estrada-De los Santos P, Bustillos-Cristales R, Caballero-Mellado J** (2001) *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2790-98.
- Farag MA, Zhang H, Ryu CM** (2013) Dynamic chemical communication between plants and bacteria through airborne signals: induced resistance by bacterial volatiles. *J. Chem. Ecol.* 39: 1007-18.
- Fasciglione G, Casanovas EM, Yommi A, Sueldo R, Barassi CA** (2012) *Azospirillum* improves lettuce growth and transplant under saline conditions. *J. Sci. Food Agric.* 92: 2518-23.
- Fernandez-Aunion C, Hamouda TB, Iglesias-Guerra F, Argandona M, Reina-Bueno M, Nieto JJ, Aouani ME, Vargas C** (2010) Biosynthesis of compatible solutes in rhizobial strains isolated from *Phaseolus vulgaris* nodules in Tunisian fields. *BMC Microbiol* 10: 192
- Fibach-Paldi S, Burdman S, Okon Y** (2012) Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* 326: 99-108.
- Fuentes-Ramírez LE, Jiménez-Salgado T, Abarca-Ocampo IR, Caballero-Mellado J** (1993) *Acetobacter diazotrophicus*, an indol acetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant Soil* 154: 145-50.
- Fuentes-Ramírez LE, Caballero-Mellado J** (2005) Bacterial Biofertilizers. In ZA Siddiqui (ed), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer Science, The Netherlands, pp 143-172.
- Fuentes-Ramírez LE, Bustillos-Cristales R, Tapia-Hernandez A, Jimenez-Salgado T, Wang ET, Martínez-Romero E, Caballero-Mellado J** (2001) Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johanna* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 1305-1314.
- Gómez-Luna BE, Hernández-Morales A, Herrera-Méndez CH, Arroyo-Figueroa G, Vargas-Rodríguez L, Olalde-Portugal V** (2012) Isolation of plant growth promoting rhizobacteria of guava plants (*Psidium guajava*). *Ra Ximhai* 8: 97-102.
- Guzmán A, Obando M, Rivera D, Bonilla R** (2012) Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). *Rev. Colomb. Biotecnol.* 14: 182-90.
- Jha CK, Patel B, Saraf M** (2012) Stimulation of growth of *Jatropha curcas* by the plant growth promoting bacterium *Enterobacter cancerogenus* MSA2. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 891-99.
- Jiménez-Delgadillo R, Virgen-Calleros G, Tabares-Franco S, Olalde-Portugal V** (2001) Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: agro-biotecnología. *Avance y Perspectiva* 20: 395-400.

- Jimenez-Salgado T, Fuentes-Ramirez LE, Tapia-Hernandez A, Mascarua-Esparza MA, Martinez-Romero E, Caballero-Mellado J** (1997) *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. *Appl Environ Microbiol* 63: 3676-3683
- Jorquera MA, Shaharouna B, Nadeem SM, de la Luz Mora M, Crowley DE** (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria associated with ancient clones of Creosote Bush (*Larrea tridentata*). *Microb. Ecol.* 64: 1008-17.
- Kamilova F, Kravchenko LV, Shaposhnikov AI, Azarova T, Makarova N, Lugtenberg B** (2006) Organic acids, sugars, and L-tryptophan in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 250-256.
- Kannan RR, Prakash VS** (2011) Molecular characterization of antagonistic *Streptomyces* isolates from a mangrove swamp. *Asian J. Biotechnol.* 3: 237-45.
- Kang SM, Khan AL, You YH, Kim JG, Kamran M, Lee UJ** (2014) Gibberellin production by newly isolated strain *Leifsonia soil* SE134 and its potential to promote plant growth. *J Microbiol Biotechnol* 24: 106-112.
- Kavamura VN, Santos SN, Silva JL, Parma MM, Avila LA, Visconti A, Zucchi TD, Taketani RG, Andreote FD, Melo IS** (2013) Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiol Res* 168: 183-191
- Kloepper JW, Schroth MN** (1978) Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In Angers (ed), *Proc. 4th Int. Conf. Plant Path. Bact.* vol. 2. INRA, Gibert-Clarey, Tours, France, pp. 879-82.
- Lucas JA, Garcia-Villaraco A, Garcia-Cristobal J, Algar E, Gutierrez-Mañero J** (2013) Structural and functional study in the rhizosphere of *Oryza sativa* L. plants growing under biotic and abiotic stress. *J. Appl. Microbiol.* 115: 218-35.
- Lugtenberg B, Kamilova F** (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541-56.
- Malik DK, Sindhu SS** (2011) Production of indole acetic acid by *Pseudomonas* sp: effect of coinoculation with *Mesorhizobium* sp. Cicer on nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*). *Physiol. Mol. Biol. Plants* 17: 25-32.
- Marín-Cevada V, Muñoz-Rojas J, Caballero-Mellado J, Mascarua-Esparza MA, Castañeda-Lucio M, Carreño-López R, Estrada-de los Santos P, Fuentes-Ramirez LE** (2012) Antagonistic interactions among bacteria inhabiting pineapple. *Applied Soil Ecology* 61: 230-235.
- Marks BB, Megias M, Nogueira MA, Hungria M** (2013) Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of Bradyrhizobium spp. and *Azospirillum brasilense* inoculants with soybean and maize. *AMB Express* 3: 21.
- Morales-García YE, Herrera MC, Muñoz-Rojas J** (2007) Cloranfenicol, un antibiótico clásico como alternativa en el presente. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 38: 58-69.
- Morales-García YE, Juárez-Hernández D, Aragón-Hernández C, Mascarua-Esparza MA, Bustillos-Cristales MR, Fuentes-Ramirez LE, Martínez-Contreras RD, Muñoz-Rojas J** (2011) Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter* spp., as a model for alternative agriculture. *Rev Argent Microbiol* 43: 287-293.
- Muñoz-Rojas J, Caballero-Mellado J** (2003) Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. *Microb. Ecol.* 46: 454-64.
- Muñoz-Rojas J, Fuentes-Ramirez LE, Caballero-Mellado J** (2005) Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54: 57-66.
- Oliveira ALM, Stoffels M, Schmid M, Reis VM, Baldani JI, Hartmann A** (2009) Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. *European Journal of Soil Biology* 45: 106-113
- Onofre-Lemus J, Hernández-Lucas I, Girard L, Caballero-Mellado J** (2009) ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in *Burkholderia* species, and its growth-promoting effect on tomato plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 6581-90.
- Ortiz-Castro R, Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, López-Bucio J** (2009) The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal Behav.* 4: 701-12.
- Park HB, Lee B, Kloepper JW, Ryu CM** (2013) One-shot-two pathogens blocked: exposure of *Arabidopsis* to hexadecane, a long chain volatile organic compound, confers induced resistance against both *Pectobacterium carotovorum* and *Pseudomonas syringae*. *Plant Signal Behav.* 8: e24619.
- Perin L, Martínez-Aguilar L, Castro-González R, Estrada-de Los Santos P, Cabellos-Avelar T, Guedes HV, Reis VM, Caballero-Mellado J** (2006) Diazotrophic burkholderia species associated with field-grown maize and sugarcane. *Appl Environ Microbiol* 72: 3103-3110.
- Perin L, Martínez-Aguilar L, Paredes-Valdez G, Baldani JI, Estrada-de Los Santos P, Reis VM, Caballero-Mellado J** (2006) *Burkholderia silvaticola* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 1931-1937.
- Poupin MJ, Timmermann T, Vega A, Zuñiga A, González B** (2013) Effects of the plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 8: e69435.
- Rajkumar M, Sandhya S, Prasas MN, Freitas H** (2012) Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* 30: 1562-74.
- Reis VM, Estrada-de los Santos P, Tenorio-Salgado S, Vogel J, Stoffels M, Guyon S, Mavingui P, Baldani VL, Schmid M, Baldani JI, Balandreau J, Hartmann A, Caballero-Mellado J** (2004) *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 2155-2162.
- Reyes I, Alvarez L, El-Ayoubi H, Valery A** (2008) Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro* 20: 37-48.
- Robles C, Barea JM** (2004) Respuesta de la planta y del suelo a inoculación con *Glomus intraradices* y rizobacterias en maíz en cultivo intensivo. *TERRA Latinoam.* 22: 59-69.
- Rodríguez H, Fraga R, González T, Bashan Y** (2006) Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil* 287: 15-21.

- Rumjanek NG, Dobert RC, van Berkum P, Triplett EW** (1993) Common soybean inoculant strains in Brazil are members of *Bradyrhizobium elkanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4371-73.
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Klopper JW, Pare PW** (2004) Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134: 1017-1026.
- Saleem M, Arshad M, Hussain S, Bhatti AS** (2007) Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34: 635-48.
- Santi C, Bogusz D, Franche C** (2013) Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Ann Bot.* 111: 743-67.
- Saravanan VS, Madhaiyan M, Osborne J, Thangaraju M, Sa TM** (2008) Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing *Acetobacteraceae* members: their possible role in plant growth promotion. *Microb. Ecol.* 55: 130-40.
- Shen M, Jun-Kang Y, Li-Wang H, Sheng-Zhang X, Xin-Zhao Q** (2012) Effect of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPRs) on plant growth, yield, and quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) under simulated seawater irrigation. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 58: 253-62.
- Stearns JC, Woody OZ, McConkey BJ, Glick BR** (2012) Effects of bacterial ACC deaminase on *Brassica napus* gene expression. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25: 668-76.
- Suman A, Shrivastava AK, Gaur A, Singh P, Singh J, et al.** (2008) Nitrogen use efficiency of sugarcane in relation to its BNF potential and population of endophytic diazotrophs at different N levels. *Plant Growth Regul.* 54: 1-11.
- Sunar K, Dey P, Chkraborty U, Chakreborty B** (2013) Biocontrol efficacy and plant growth promoting activity of *Bacillus altitudinis* isolated from Darjeeling hills. *J. Basic Microbiol.* 10: 1002-1014.
- Tenorio-Salgado S, Tinoco R, Vazquez-Duhalt R, Caballero-Mellado J, Pérez-Rueda E** (2013) Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. *Bioengineered* 4: 236-43.
- Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud ML, Touraine B, Moenne-Loccoz Y, Muller D, Legendre L, Wisniewski-Dye F, Prigent-Combaret C** (2013) Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci* 4: 356
- Van Loon LC** (2007) Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119: 243-54.
- Vilchez S, Manzanera M** (2011) Biotechnological uses of desiccation-tolerant microorganisms for the rhizoremediation of soils subjected to seasonal drought. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91: 1297-304.
- Valery A, Reyes I** (2013) Evaluation of growth promoting rhizobacteria under different fertilization schemes in maize variety HIMECA-95. *Rev. Colomb. Biotechnol.* 2: 80-88.
- Vyas P, Gulati A** (2009) Organic acid production *in vitro* and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC Microbiol.* 9: 174-89.
- Zhang H, Kim MS, Krishnamachari V, Payton P, Sun Y, Grimson M, Farag MA, Ryu CM, Allen R, Melo IS, Pare PW** (2007) Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta* 226: 839-851.
- Zhang H, Sun Y, Xie X, Kim MS, Dowd SE, Pare PW** (2009) A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. *Plant J* 58: 568-577
- Zhu XF, Zhou Y, Feng JL** (2007) Analysis of both chitinase and chitosanase produced by *Sphingomonas* sp. CJ-5. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 8: 831-38.

Inoculantes

La capacidad de las PGPR para potenciar el crecimiento de las plantas, ha desencadenado la formulación de inoculantes para una aplicación biotecnológica-agrícola en diferentes lugares del mundo. Los inoculantes son formulaciones constituidas por un soporte (sólido, líquido o gel) que contiene bacterias vivas capaces de beneficiar a su planta hospedera mediante el aumento de la germinación, biomasa y la protección en contra de fitopatógenos, además de conferirles mayor resistencia a las plantas a condiciones estresantes ambientales; como la congelación, salinidad (Rojas-Tapias *et al.* 2012), desecación (Thakur *et al.* 2017) y contaminación por compuestos xenobióticos (Singh *et al.* 2014); (Vilchez and Manzanera 2011).

Dependiendo del mecanismo y el tipo de beneficio que confiere el microorganismo a la planta, los inoculantes podrían clasificarse en diferentes tipos. Los fitoestimulantes; son aquellos inoculantes con rizobacterias productoras de hormonas (Reddy and Saravanan 2013). Los biofertilizantes son los inoculantes que contienen microorganismos con capacidad de fijar nitrógeno y solubilizar fosfatos. Los agentes de biocontrol son inoculantes formulados con bacterias que eliminan patógenos (Marín-Cevada *et al.* 2012; Ortíz-Castro *et al.* 2009). Los inoculantes que contienen PGPR biorremediadoras son capaces de remover xenobióticos tóxicos que contaminan y que afectan negativamente a la salud de la planta (Vilchez and Manzanera 2011).

Los modelos de rizobacterias que se han estudiado y probado ampliamente para la formulación de inoculantes son *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas* sp. (Kang *et al.* 2014; Rojas-Tapias *et al.* 2012).

Los biofertilizantes formulados con *A. brasilense* y *A. lipoferum* se han aplicado a cientos de miles de hectáreas en Latinoamérica (Fuentes Ramirez and Caballero Mellado 2005; Chauhan *et al.* 2015; Atieno *et al.* 2012; Fasciglione *et al.* 2012), con resultados donde se observó el incremento de la biomasa y el rendimiento de diversas plantas de importancia agrícola, para la mayoría de los cultivos analizados (Fuentes-Ramírez & Caballero-Mellado 2005). Sin embargo, también se han observado resultados en donde los parámetros de crecimiento y producción no están incrementados, sugiriendo que algunos factores como el tipo de suelo (Mosimann *et al.* 2017), la interacción inadecuada de genotipo de la bacteria y variedad de la planta (Imran *et al.* 2015; De Oliveira *et al.* 2006; J. Muñoz-Rojas and Caballero-Mellado 2003), el estrés hídrico, entre otros, impiden una adecuada interacción bacteria-planta o una expresión disminuida de genes de relevancia (Baez-Rogelio *et al.* 2017).

El empleo de inoculantes en la práctica agrícola, resulta una opción atractiva para desarrollar una agricultura sustentable y amigable con el ambiente, lo que podría contribuir al incremento de la productividad, la disminución del deterioro del suelo agrícola y concomitantemente una disminución de la contaminación de los mantos acuíferos, debido al mejor aprovechamiento de los compuestos nitrogenados y la disminución del uso de pesticidas y/o herbicidas (Rumjanek *et al.*, 1993; Guzmán *et al.*, 2012; Pazos-Rojas *et al.*,

2016). Además los inoculantes impactan de forma importante en los costos de los insumos agrícolas disminuyendo los costos en comparación con el uso tradicional de fertilizantes químicos (Barea *et al.*, 2002; Thilagar *et al.*, 2016).

Inoculantes de segunda generación: consorcios microbianos

En el suelo los microorganismos viven en comunidades, algunas rizobacterias proporcionan diversos beneficios a la planta. Cuando los consorcios son empleados como inoculantes, estos interactúan con su planta hospedera, simulando las interacciones que se llevan a cabo en el suelo (Sarma *et al.*, 2015).

Se ha documentado en diversos estudios que la inoculación de más de dos PGPR (consorcio) a la semilla, mejora notablemente la promoción del crecimiento de la planta en comparación con la inoculación de una sola PGPR, cuyo análisis experimental se ha realizado en diferentes modelos vegetales (Singh *et al.* 2014; Sundaramoorthy *et al.* 2012; Kumar *et al.* 2016). Los beneficios de las plantas al ser inoculadas con un consorcio bacteriano, son de mayor impacto en comparación a los beneficios que recibe la planta cuando es inoculada con una sola especie bacteriana, como ha sido reportado para la promoción de crecimiento y la estimulación de respuesta de la Respuesta Sistémica Inducida (ISR por sus siglas en inglés) en una planta hospedera (Sarma *et al.* 2015). Sin embargo, el diseño, formulación y optimización de una eficiente mezcla bacteriana (consorcio) requiere desarrollar un entendimiento de la interacción básica, como la adhesión de las bacterias a la semilla y su capacidad de colonizar las raíces de las plantas (Sundaramoorthy *et al.* 2012; Singh *et al.* 2014) y otros factores de la co-interacción bacteria-bacteria y bacteria-planta.

Como ejemplos de consorcios efectivos se ha reportado que el consorcio microbiano formulado con *Funneliformis mosseae* y *Bacillus sonorensis*, mostraron un efecto sinérgico que promovió la producción de plantas de chile, así como el crecimiento y su contenido nutricional (Thilagar *et al.*, 2016). Otro consorcio formulado con *Pseudomonas aeruginosa* (PHU094), *Trichoderma harzianum* (THU0816) y *Mesorhizobium* sp. (RL091), fue capaz de incrementar el crecimiento de chícharo y además de estimular la producción de compuestos fenólicos en la planta para potenciar la defensa contra *Sclerotium rolfsii* (Singh *et al.* 2014). También ya se ha documentado que los consorcios (formulados con dos bacterias) mejoran la cascada de señalización de defensa guiando a un incremento de la activación transcripcional de algunas vías metabólicas (Singh *et al.* 2014; Wang *et al.* 2012). Sin embargo, se ha documentado que algunos consorcios microbianos no proporcionan efectos benéficos a su planta hospedera (Sarma *et al.* 2015), por lo que es importante evaluar cada consorcio que se proponga como inoculante para su uso en la agricultura, a pesar de que las bacterias sean promotoras del crecimiento de plantas cuando se inoculan de forma independiente. Los posibles efectos antagonistas entre las bacterias de un consorcio deben ser evaluadas ya que de una buena compatibilidad entre microorganismos de un consorcio derivará un buen establecimiento de los microorganismos

es su ambiente y por lo tanto de una buena oportunidad para observar los efectos deseados (Vivanco-Calixto *et al.* 2016). Por lo anterior, es importante estudiar los efectos antagónicos que se pudieran establecer entre los géneros bacterianos que conforman el consorcio.

Relaciones antagónicas

Los microorganismos compiten intensamente por los nutrientes en su hábitat, por lo que han desarrollado diversas estrategias entre las que destaca el antagonismo (Czaran, Hoekstra, and L 2002). El antagonismo de un microorganismo hacia otro podría ser causado por diversas sustancias antimicrobianas que son producidos durante la interacción entre las que destacan los antibióticos, sideróforos y bacteriocinas. Estas interacciones desempeñan una función importante en la rizósfera del ambiente (Jesús Muñoz-Rojas, Fuentes-Ramírez, and Caballero-Mellado 2005).

Las bacteriocinas son moléculas de bajo peso molecular de naturaleza proteica, que son consideradas como sistemas de defensa para las bacterias productoras, estas moléculas presentan motivos con actividad biológica bactericida, esta familia incluye una gran diversidad de proteínas con diversos tamaños, blancos microbianos, mecanismos de inmunidad y diversos modos de acción (Riley and Wertz 2002). Se ha documentado que el 99% de todas las bacterias por lo menos producen un tipo de bacteriocina; también se ha estudiado que la producción de este mecanismo antimicrobiano genera un importante gasto energético de la cepa productora, y que las bacteriocinas juegan un papel importante mediando las poblaciones bacterianas y la interacción en la comunidad microbiana de un ambiente (Riley 2009).

Las bacteriocinas pueden actuar como anticompetidores que permiten la invasión de una cepa en una comunidad microbiana establecida, otra función de estas moléculas es la defensa en contra de otras cepas u otras especies bacterianas, para evitar que otras bacterias ocupen el hábitat o limiten el establecimiento de células vecinas; otro papel que se ha documentado a las bacteriocinas gram positivas es la mediación del *quorum sensing* (Hibbing *et al.* 2010); se ha evidenciado que la función de las bacteriocinas cambia a medida que cambian las condiciones ambientales bióticas como abióticas (Riley & Wertz 2002).

Se ha propuesto un modelo de cómo las bacteriocinas permiten un equilibrio *quasi-estable*, en la interacción de tres cepas que pueden persistir en una comunidad establecida. El modelo de piedra, papel o tijera, explica que la cepa productora de la bacteriocina supera a la cepa sensible, debido al efecto tóxico de la proteína sobre la bacteria sensible; por otra parte la cepa sensible supera a la cepa resistente a la bacteriocina, porque la bacteria resistente presenta un gasto energético para generar inmunidad (Riley and Wertz 2002). La cepa resistente supera a la bacteria productora, por el enorme gasto energético para producir la bacteriocina en contra de menor gasto energético para generar resistencia. En un entorno

estructurado, esta interacción permite ciclos periódicos, en los que los tres (sensible, resistente y productora) tipo de cepas co-existen indefinidamente pero cada cepa con una población fluctuante (Hibbing *et al.* 2010).

Por otra parte, los sideróforos bacterianos son péptidos y moléculas de bajo peso molecular, con capacidad de quelar y reducir la forma insoluble de Fe^{3+} , estas moléculas tienen un gran potencial para el control biológico de hongos y bacterias fitopatógenas (Beneduzi *et al.*, 2012). Debido a la importancia de este elemento en diversos procesos celulares, ya que la disponibilidad de este elemento es determinante en el éxito o fracaso de microorganismos patógenos o simbióticos para invadir o colonizar a su organismo blanco, excluyendo a los microorganismos no productores de sideróforos de estos hábitats (Rajkumar *et al.* 2012; Aguado-Santacruz *et al.* 2012). Las PGPR productoras de sideróforos emplean estas moléculas como un mecanismo indirecto de promoción del crecimiento vegetal, mediante el biocontrol de fitopatógenos (Beneduzi *et al.*, 2012).

Otras sustancias producidas por las rizobacterias para establecer relaciones antagónicas son los antibióticos, por ejemplo el 2,4-diacetilfluoroglucinol (DAPG) es una molécula antibiótica producida por bacterias pertenecientes a la familia Pseudomonadaceae, esta molécula es capaz de dañar membrana celular de algunos hongos fitopatógenos (Beneduzi, Ambrosini, and Passaglia 2012), por otra parte DAPG es una molécula señal capaz de inducir la Resistencia Sistémica inducida (ISR, por sus siglas en Inglés) (Vacheron *et al.* 2013).

En general, las PGPR producen sustancias inhibitorias utilizadas como mecanismo de competencia para ganar nutrientes y para estimular el crecimiento vegetal de forma indirecta (bacteriocinas, sideróforos o antibióticos) (Babalola 2010; Beneduzi, Ambrosini, and Passaglia 2012). A pesar de producir sustancias antagonistas, estas rizobacterias son capaces de coexistir en consorcio con múltiples microorganismos e interactuar con alguna planta para promover su crecimiento.

Maíz e inoculantes

El maíz (*Zea mays*) es uno de los granos alimenticios más antiguos que se conocen y en la actualidad es de gran importancia económica. Perteneciente a la familia de las Poáceas (Gramíneas), un pasto gigante doméstico de la tribu Maydeas; es la única especie cultivada de este género. Se considera que el centro de origen, domesticación y diversificación del maíz es México. Este cereal tiene una gran variabilidad genética como resultado de los procesos de selección, adaptación y manejo humano. Existen 59 razas de acuerdo con la clasificación basada en características fenotípicas y polimorfismos de algunas isoenzimas (Salinas-Moreno, Jesús, and Edgar 2010; Suárez, Morales, and Gálvez 2013), no obstante, es importante mencionar que muchas de las variedades criollas aún no han sido caracterizadas.

El maíz es una planta de ciclo biológico anual y crecimiento determinado. Una característica de esta gramínea es su tamaño; sus hojas son alargadas y angostas, ubicadas una frente a la otra con un tallo rígido; además de distinguirse por tener flores imperfectas que separan los sexos de las mismas en las distan estructuras florales. El maíz produce flores femeninas ubicadas ápice de los primordios de las ramas laterales que emergen de las axilas foliares mientras que las flores masculinas coronan a la planta en el ápice del tallo (Salvador 2001).

La diversidad de los ambientes bajo los cuales es cultivado el maíz es mucho mayor que la de cualquier otro cultivo. Se clasifica como una planta C4 (alto metabolismo fotosintético). Germina de dos a tres días en temperatura cálidas de 15 a 20 °C, así como en baja intensidad de luz solar y un buen grado de humedad, adaptándose adecuadamente a cualquier tipo de suelo. Sin embargo, los suelos óptimos son aquellos con un rango de pH de 6 a 7 (Salvador 2001). Bajo condiciones de laboratorio se pueden obtener semillas axénicas que son germinadas adecuadamente en un tiempo de 3 días (Corral-Lugo *et al.* 2012; Morales-García *et al.* 2012).

Este cereal presenta diferentes razas y diversos fenotipos de coloraciones de grano: blanco, amarillo, naranja, azul, morado y rojo, debido a la presencia de pigmentos como antocianinas o carotenoides y compuestos fenólicos; que son sintetizados en la planta por metabolismo secundario, aunque estos pigmentos no representan un valor nutritivo, si confieren beneficios a la salud por su actividad antioxidante y bioactivadores; con capacidad de disminuir enfermedades cardiovasculares, cataratas, enfermedades degenerativas del cerebro y cáncer (Lopez-Martinez *et al.* 2009).

El desarrollo de la tecnología para el cultivo del maíz ha propiciado una revolución agrícola generalizada en muchas partes del mundo. Actualmente es el cultivo con mayor producción a nivel mundial, superando al trigo y al arroz. Es el cereal con mayor rendimiento de grano por hectárea, y está en segundo lugar, después del trigo, en producción total (Žalud *et al.* 2017). El maíz es ampliamente cultivado en diversos climas como tropical, subtropical y templado.

El maíz es de gran importancia económica a nivel mundial ya sea como alimento humano, alimento forrajero y materia prima para un gran número de productos industriales como fibras, aceites, fuente de almidón, bebidas, combustible biodegradable, alcohol, materia prima para pegamentos y botanas entre otros (Suárez, Morales, and Gálvez 2013; Žalud *et al.* 2017). Es el único cereal que puede ser utilizado como alimento en distintas etapas del desarrollo de la planta (Suárez, Morales, and Gálvez 2013; Lopez-Martinez *et al.* 2009).

En México este cereal es destinado diferentes rubros, 69% del maíz producido es destinado al consumo humano, 20% al sector pecuario, 10% a la industrialización el 1% a la producción de semilla (Salinas-Moreno, Jesús, and Edgar 2010).

Se puede clasificar al maíz en: maíz tropical y maíz templado, dependiendo de la zona de su cultivo (Dowswell et al. 1996). El maíz tropical es aquel que se siembra en ambientes cálidos en la línea ecuatorial y a 30° latitud norte y sur. Mientras que el maíz sembrado a altitudes mayores de 34° de altitud norte y sur, son clasificados como maíz de zona templada. Los maíces subtropicales crecen entre las latitudes de 30° y 34° de ambos hemisferios. Esta es una descripción muy general ya que los maíces tropicales y templados no obedecen a límites regionales o latitudinales rígidos (Dowswell et al. 1996). Gracias a la versatilidad de su crecimiento, en la actualidad el maíz también se cultiva en países donde tradicionalmente no había sido sembrado como en Benín (África) y China (Asia) (Adjanothoum *et al.* 2011; Noumavo *et al.* 2013; Sheng *et al.* 2012).

Los principales países de producción de maíz son: Estados Unidos, China, Países de la Unión Europea, Brasil, Argentina y México. Entre el año 2000 y 2010 la superficie sembrada de maíz en México disminuyó 7.1%, al pasar de 8.4 a 7.8 millones de hectáreas, mientras que la superficie cosechada se mantuvo en promedio en 7.2 millones de hectáreas en ese periodo.

En años recientes se ha reportado el cultivo de 8 millones de hectáreas de toda la superficie nacional, esto representa alrededor del 90% de la producción nacional, esta producción de maíz fue destinada al consumo humano; y en 2014 se reportó una producción de maíz de 18 millones de toneladas anuales (Paulino-Flores *et al.* 2017).

En nuestro país existe una gran diversidad de variedades de maíz azul, estas se agrupan en varias razas, la raza Chalqueño empleada para cultivo en riego y la raza Cónico para cultivo en temporal predominan en Valles Altos de la Mesa Central; mientras que en el noreste predomina la raza Tabloncillo (Agama-Acevedo *et al.* 2011).

Dependiendo de la raza, los fenotipos presentan variabilidad en tamaño, densidad, morfología del grano de almidón y dureza del grano y su composición química, la variabilidad fenotípica también depende de las prácticas de cultivo, condiciones climáticas y tipo de suelo, así como la interacción entre estos factores (Agama-Acevedo *et al.* 2011).

Los principales estados de la Mesa Central donde se cultiva maíz azul son: Puebla, Tlaxcala, México e Hidalgo. Los rendimientos por hectárea del grano azul en zonas de riego oscilan de 1.02 a 3.36 tonelada por hectárea (t/ha); sin embargo, se ha reportado para la raza Chalqueño un rendimiento de 2.9 a 5.4 t/ha (Salinas-Moreno *et al.*, 2010) y otros reportes de rendimiento para esta raza ha sido de 6.7 t/ha.

La mayoría de los maíces azules son típicamente de grano harinoso; el endospermo es de textura suave y el color azul se encuentra en la capa celular aleurona, en esta capa es donde se acumulan las antocianinas, pigmentos solubles en agua y que pertenecen al grupo de los flavonoides (Salinas-Moreno *et al.*, 2010). Las antocianinas simples reportadas para maíz son: cianidina 3- glucósido (grano azul y morado), pelargonidina 3-glucósido y peonidina

3-glucósido (grano rojo).

Varios genes controlan la expresión de color en la capa aleurona, el color púrpura intenso requiere la presencia de un alelo dominante en cada gen: A-1, A-2, Bz-2, C-1, C-2, Dek-1, Pr, R y Vp-1. La pigmentación azul se intensifica si el gen que codifica el factor *in* es homocigoto recesivo (Ramírez *et al.* 2003).

El maíz azul reporta características nutricionales peculiares como: menor cantidad de almidón, un índice glucémico inferior en comparación a maíz amarillo; y una carga proteica 20% superior en comparación al maíz blanco (Marín-Cevada *et al.* 2012)(Castañeda-Sanchez 2011).

En nuestro país el maíz azul es uno de los fenotipos de maíz más utilizados para preparar la comida tradicional como: tlacoyos, pinole y elotes, por otra parte tiene potencial para la extracción de antocininas para la extracción de pigmentos naturales que son empleados como colorantes en vinos, mermeladas y jugos de frutas (Ramírez *et al.* 2003); además este cereal se ha empleado para elaborar comida funcional como tortillas, frituras y barras de cereal, debido a su alto contenido de antocianinas; estas son compuestos fenólicos con características antioxidantes y actividad antiproliferativa (Camelo-Méndez *et al.* 2016), con potencial para la promoción y mantenimiento de la salud humana (Lopez-Martinez *et al.* 2009).

La temperatura óptima de crecimiento del maíz es de 25°C; sin embargo, cuando este cereal se enfrenta a temperaturas mayores a 35°C y a baja humedad relativa provoca la desecación de los estigmas. Por otra parte, cuando la planta se enfrenta a temperaturas superiores a 38°C se reduce la viabilidad del polen, también se ha sugerido que por cada grado centígrado que se incrementa la temperatura por arriba de la óptima se reduce el rendimiento del grano entre 3 a 4 % (Lu *et al.* 2013).

La inoculación de bacterias tipo PGPR en el cultivo de maíz, se ha tomado como una alternativa interesante, debido a la gran demanda de este cereal a nivel alimenticio y su carácter de materia prima en la industrial. Por otro lado, algunas variedades de maíz requieren altas tasas de fertilización, particularmente la fertilización nitrogenada para alcanzar el máximo de la producción del cereal, no obstante, la absorción del nitrógeno en la planta solo alcanza de un 30-50% del total del fertilizante nitrogenado aplicado a la planta (Hodge, Robinson, and Fitter 2000), el resto de nitrógeno es absorbido por el suelo o lixiviado al subsuelo y provoca efectos adversos sobre el medio ambiente (Pazos-Rojas *et al.* 2016).

El empleo de PGPR, como biofertilizantes para vegetales, con capacidad de fijar nitrógeno puede disminuir la aplicación de fertilización química e incrementar el crecimiento y la productividad de la planta (Lugtenberg and Kamilova 2009).

Otro beneficio atractivo del uso de inoculantes bacterianos es la disminución de costos de producción agrícola (Inostroza *et al.* 2017) debido a la reducción de fertilizantes químicos, el empleo de inoculantes puede impactar en el incremento de la producción de forma similares o superiores en comparación a al uso de fertilizantes químicos. Impactando de forma directa en menor contaminación ambiental (Thilagar, Bagyaraj, and Raoca 2016; Chauhan *et al.* 2015). Algunos ejemplos del efecto de inoculantes sobre el crecimiento de maíz se muestran a continuación:

Se ha documentado el efecto de la inoculación de maíz con *Glomus intraradices* y *Pseudomonas fluorescens* cuando es inoculado con ambos microorganismos y en forma individual, reportando mejores parámetros de crecimiento para el maíz cuando es co-inoculado en comparación a la mono-inoculación y el control no inoculado, en este trabajo se reportó mayor producción de grano, contenido de fósforo y nitrógeno en el grano, y un índice de cosecha bajo en condiciones de estrés por déficit de agua (Ehteshami *et al.* 2007).

Otro ejemplo de la aplicación de biofertilizantes en maíz es la inoculación de PGPR aisladas: *Klebsiella* sp. Br1, *Klebsiella pneumoniae* Fr1, *Bacillus pumilus* S1r1 y *Acinetobacter* sp. S3r2 y la cepa de referencia *Bacillus subtilis* UPMB10, todas estas bacterias presentaron solubilización de fosfatos, producción de auxinas y fijación biológica de nitrógeno *in vitro*. La inoculación de maíz con cada rizobacteria fue superior en comparación al tratamiento no inoculado; sin embargo, la inoculación de *Bacillus pumilus* S1r1 registró el mayor incremento en la biomasa de parte aérea y la raíz, contenido de nitrógeno, además de retraso en la senescencia del maíz, este último parámetro es un indicativo de mejor producción de grano (Kuan *et al.* 2016).

También se ha evaluado el efecto de la inoculación de rizobacterias aisladas con la capacidad de producir la enzima aminociclopropano- 1- carboxilato (ACC) desaminasa y fijar nitrógeno atmosférico. Los resultados observados de la inoculación de maíz con la cepa AN8 fue una máxima eficiencia en el incremento de la altura de la parte aérea, longitud de la raíz, mayor cantidad de clorofila a, b y carotenoides, proteínas y prolina, además de presentar mayor actividad enzimática peroxidasa, catalasa y glutatión S-transferasa y también les confirió a las plantas de maíz mayor resistencia ante concentraciones altas de plomo, disminuyendo los efectos deletéreos a las plantas por la presencia de este metal pesado (Hassan *et al.* 2014).

Los trabajos antes mencionados y otros ya reportados han estudiado la inoculación del maíz amarillo con diversos géneros de PGPR, sin embargo, aún no se ha explorado la inoculación de maíz azul criollo, variedad autóctona de México.

Desecación bacteriana

La desecación representa un estrés abiótico altamente limitante para el crecimiento y supervivencia de cualquier organismo, tanto procarionte como eucarionte (Potts 1994). Se han reportado algunos organismos que pueden tolerar la pérdida de agua intracelular hasta alcanzar 0.01 g de agua por 1 g de masa celular seca, estos organismos son llamados anhidrobióticos y se caracterizan por reanudar su actividad metabólica y fisiológica ante el proceso de rehidratación (Vilchez and Manzanera 2011).

En la agricultura la escasez de agua impacta de forma negativa en la productividad de las plantas y se ha estimado la reducción de la productividad de un 9 a 10% y la biomasa para el ensilaje (Ngumbi and Kloepper 2016; Žalud *et al.* 2017); incluso se ha reportado que la sequía agrícola lleva a la pérdida de las cosechas, reportándose estos episodios con mayor frecuencia en Europa Central en recientes años (Žalud *et al.* 2017). Por lo anterior, existe la necesidad de encontrar una estrategia para incrementar la tolerancia de las plantas a la desecación y que permita el crecimiento de las cosechas a pesar de crecer en condiciones limitadas de agua para solventar la demanda de alimentos (Ngumbi and Kloepper 2016).

Se ha documentado que las PGPR pueden solventar y ayudar a las plantas a tolerar este tipo de estrés. Estas rizobacterias se adhieren y colonizan la rizósfera de las plantas con las que interactúan y les confieren efectos benéficos (Vilchez *et al.* 2016; Thakur *et al.* 2017). Estos microorganismos benéficos presentan diversos mecanismos para tolerar a la desecación como: producción de exopolisacárido (EPS) (Alami *et al.* 2000), la enzima 1-aminociclopropano, 1 carboxilato (ACC) desaminasa (Thakur *et al.* 2017; Vilchez *et al.* 2016), producción de fitohormonas AIA (Kang *et al.* 2014), compuestos orgánicos volátiles (VOC) (Molina-Favero *et al.* 2008), induciendo la acumulación de osmolitos (Sandhya *et al.* 2010; Ansary *et al.* 2012; Vilchez *et al.* 2016), antioxidantes (Sandhya *et al.* 2010; Kumar *et al.* 2016), estimulación de la expresión de genes a respuestas a estrés (Timmusk and Wagner 1999); en planta en particular estimulan el cambio morfológico en el sistema radicular para tolerar la desecación (Vurukonda *et al.* 2016).

Se ha reportado que la producción exógena de fitohormonas por parte de las PGPR, desempeñan como función principal la estimulación de la producción de hormonas endógenas de la planta, lo que confiere a la planta una mayor resistencia a la desecación, un ejemplo es *A. brasilense* que produce óxido nítrico, esta molécula actúa como molécula señal en la vía de síntesis de AIA, en consecuencia, la síntesis de la fitohormona controla la senescencia de la planta y ayuda al desarrollo de las raíces adventicias en las plantas de tomate para contener el déficit de agua (Molina-Favero *et al.* 2008; Vurukonda *et al.* 2016). También se ha reportado que en plántulas de maíz inoculadas con *A. brasilense* y *A. lipoferum* se mejora el contenido de agua absoluta y relativa comparada con plantas no inoculadas, bajo condición de estrés por desecación, además de incrementar el crecimiento de la raíz, área foliar, la biomasa y acumulación de prolina en hojas y raíz (Bano *et al.* 2013; Vurukonda *et al.* 2016). Por otra parte se ha reportado que plantas de soja inoculadas

con giberelinas secretadas de *P. putida* H-2-3 mejoran el crecimiento de la planta bajo condiciones de estrés hídrico (Kang *et al.* 2014).

Las PGPR secretan osmolitos en respuesta a estrés por desecación e incrementan la producción de prolina en maíz cuando es inoculado con *P. fluorescens* bajo condiciones de desecación, estos actúan sinérgicamente con los osmolitos producidos por la planta, este osmolito ayuda a la membrana de planta proporcionando el balance osmótico (Ansary *et al.* 2012). La acumulación de prolina actúa como buffer redox celular potencial bajo diferentes estreses como desecación y alta concentración salina (Kumar *et al.* 2016).

La mayoría de los inoculantes son aplicados a la semilla, mediante la técnica de adhesión de la formulación a las semillas; posteriormente estas pueden ser: almacenadas, vendidas o sembradas. La sobrevivencia de las bacterias en las semillas inoculadas, incluso en la misma formulación puede ser afectada por factores como desecación y altas temperaturas, lo que impacta directamente en las poblaciones bacterianas con la que están formuladas los inoculantes (Albareda *et al.* 2008).

Se ha documentado que algunos organismos anhidrobióticos son capaces de acumular grandes cantidades de exopolisacáridos (EPS) o disacáridos como sacarosa y trehalosa (Reina-Bueno *et al.* 2012), para tolerar la desecación, sugiriendo una función de protección a las enzimas, mediante el reemplazo de las moléculas del agua que interaccionan con las biomoléculas (Potts 1994; Leslie *et al.* 1995). El EPS genera un microambiente que evita la pérdida de agua de forma rápida, mejorando la agregación del suelo y manteniendo un potencial de agua alto alrededor de la raíz, en consecuencia se incrementa la absorción de nutrientes en la planta, generando un incremento del crecimiento vegetal y la protección de las rizobacterias y las raíces de las plantas en contra de la desecación (Vurukonda *et al.* 2016).

El estrés por desecación es particularmente importante cuando se formulan inoculantes con rizobias, presentando disminución de la viabilidad durante el almacenaje del inoculante y después de la inoculación de semillas y al sembrarlas en el suelo si no hay disponibilidad oportuna de agua (Reina-Bueno *et al.* 2012; Streeter 2003). Sin embargo, existen otras rizobacterias capaces de tolerar la desecación en suelo y en inoculantes durante una vida de anaquel, con esta tolerancia estas bacterias podrían mejorar la colonización de la planta bajo condiciones de baja disponibilidad de agua (Albareda *et al.* 2008; Streeter 2003).

La exploración de las capacidades de tolerancia a la desecación en bacterias benéficas aún no ha sido explorada exhaustivamente. Sin embargo, las bacterias que toleren mejor a la desecación serán las que a pesar de la baja disponibilidad de agua, serán más efectivas para recuperar sus funciones beneficiosas para las plantas (Muñoz-Rojas 2011).

ANTECEDENTES

Se ha probado una amplia variedad de PGPR para la promoción del crecimiento vegetal de maíz en mono-inoculación con efectos positivos en el incremento de producción y biomasa. Por otra parte, hay estudios donde se ha probado la co-inoculación de dos cepas bacterianas como el caso de *A. brasilense* AZ39 y *Bradyrhizobium* sp., donde se evidenció la capacidad de fitoestimulación de las dos bacterias tanto en forma individual como en consorcio, observando que en consorcio el beneficio es superior, tanto para la germinación temprana como para el incremento del peso seco de la parte aérea maíz y soya (Cassán *et al.* 2009).

La inoculación de un consorcio de tres microorganismos (*Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. y micorriza arbuscular (AMF) en maíz, también ha sido explorada, observando que el consorcio mejora la tolerancia de planta de maíz al estrés por sequía, aumenta el contenido de minerales en hojas e incrementa la producción de biomasa en el maíz inoculado en comparación a la inoculación de plantas con cada microorganismo (Zoppellari *et al.* 2014).

Por otra parte, se han documentado los beneficios que proporciona la multi-inoculación de PGPR en diversos modelos vegetales diferentes al maíz; un ejemplo es el estudio en chícharo que fue multi-inoculado con *Serratia marcescens* (SF3), *Serratia* spp. (ST9), y *Mesorhizobium ciceri*, reportando el incremento del número de nódulos por planta, el peso seco de los nódulos, producción de grano, contenido de proteína y la cantidad de clorofila, en comparación con la inoculación de plantas de chícharo con las bacterias de forma individual (Shahzad *et al.* 2013). En caña de azúcar se ha demostrado que la multi-inoculación con cinco rizobacterias: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. Amazonense*, *Paraburkholderia tropica* incrementa la producción de tallo en suelo con bajo nivel de fertilización (De Oliveira *et al.* 2006).

En el grupo de investigación de Ecología Molecular Microbiana una de las líneas de investigación se centra en generar formulaciones de inoculantes multi-especies (consorcios) que sean compatibles. Morales-García *et al.*, 2013 exploró las relaciones inhibitorias entre diversos géneros bacterianos, con los resultados de estos experimentos se propuso una formulación bacteriana para la elaboración de inoculantes multi-especies denominada EMMIM-1 y que fue patentada ante el Instituto Mexicano de Propiedad Industrial (IMPI) (Morales-García *et al.* 2016). La formulación multiespecies EMMIM-1 está conformada por seis cepas bacterianas: *P. putida* KT2440, *Paraburkholderia unamae* MTL-641^T, *Sphingomonas* sp. OF178, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5, *Bradyrhizobium* sp MS22 y *Azospirillum brasilense* Sp7. Cinco de estas cepas han sido reportadas como promotoras del crecimiento de plantas, 4 como bioremediadoras de tóxicos y las 6 como productoras de sustancias inhibitorias contra patógenos; pero a pesar de la producción de estas sustancias inhibitorias son compatibles entre ellas, tanto en medios de cultivo como en asociación con plantas (Morales-García *et al.*, 2013). Se realizaron experimentos de inoculación de este consorcio en maíz rojo criollo, bajo condiciones de invernadero,

observando resultados positivos en el tamaño de las plantas en comparación a las mono-inoculadas y las no inoculadas. Posteriormente en campo se observó que el rendimiento en la producción de mazorca debido a la inoculación del consorcio EMMIM-1 en el maíz rojo, fue de seis veces mayor al de plantas control (no inoculadas). La promoción del crecimiento de diferentes variedades de maíz inoculadas con el consorcio EMMIM-1 ha sido explorada bajo condiciones de campo (Morales-García *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos muestran que el consorcio promueve el crecimiento de algunas variedades como el pozolero, amarillo, rojo y pinto criollo; sin embargo, no se observó una buena promoción de crecimiento con las variedades blanco y azul criollo. Esta formulación multi-especies posteriormente fue explorada en diversas plantas con resultados positivos (Morales-García *et al.* 2016). Por ejemplo, En 2014 Santiago-Saenz probó el inoculante multi-especie EMMIM-1 para evidenciar su capacidad de estimular el crecimiento vegetal de la papa (*Solanum tuberosum* variedad Atlantic) (Santiago-Saenz & Muñoz-Rojas 2014), los resultados obtenidos demostraron que el consorcio EMMIM-1 estimuló el incremento de la longitud del tallo, longitud de la raíz, pesos secos de parte aérea y raíz, además de incrementar la producción y el peso seco de los tubérculos en comparación a las plantas control. Debido al éxito en la promoción de crecimiento otorgado por la formulación multi-especies EMMIM-1 un convenio entre la Asociación Nacional de Empresas Campesinas y la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla fue establecido para usar este producto en campos agrícolas de México (Vivanco-Calixto *et al.* 2016).

En 2013 Alatorre-Cruz propuso tres consorcios bacterianos, cuyas características fueron: bacterias resistentes a la desecación y que promovieran de forma superior la promoción del crecimiento de la cactácea en comparación a la promoción del crecimiento de la inoculación individual (Alatorre-Cruz & Muñoz-Rojas 2013).

La mezcla de bacterias EMMIM-3 se formuló con *Paraburkholderia unamae* MTL-641^T, y dos cepas metilotróficas denominadas 4MePi8 y RhPi14, la inoculación individual de estas cepas promovió el crecimiento vegetal, sin embargo, en consorcio no se observó sinergia entre las bacterias, donde se observó el desarrollo de la cactácea similar al tratamiento control (no inoculado). El consorcio EMMIM-4 formulado con las cepas: RhPf3, 4MEPi8, *Sphingomonas* sp. OF178 y *P. putida* KT2440, incrementó la biomasa de *E. platyacanthus*. Por otra parte, el consorcio EMMIM-JMAC constituido por las cepas metilotróficas RhPf3, 4MEPi8 y *P. putida* KT2440, mostró una sinergia entre las bacterias incrementando la biomasa e incrementó la nacencia de las semillas en comparación a los controles y a la inoculación individual.

El éxito de una formulación multi-especies podría deberse a que alguno de los microorganismos presentes en la formulación podrían actuar positivamente en alguna de las condiciones exploradas a pesar de que los otros no sean efectivos en esa condición. Contrario a lo que ocurre con una formulación mono-especie, si ese microorganismo no actúa en la condición explorada, no observaremos ningún beneficio tras la inoculación. Aún

falta por explorar el comportamiento de más inoculantes multi-especies y una de las limitantes más fuertes es contar con medios de selección para cada cepa que conforma un inoculante que discrimine efectivamente el crecimiento de las otras cepas, con el fin de seguir el comportamiento de cada cepa durante la co-interacción. Esfuerzos recientes para la caracterización molecular de los miembros de un inoculante multi-especies también se están iniciando con el propósito de monitorear a los miembros de un consorcio de una forma más efectiva (Morales García Yolanda Elizabeth, Rodríguez Andrade Osvaldo, Tenorio Ana Laura, Juárez Hernández Dalia, and Jesús 2014).

JUSTIFICACIÓN

Los inoculantes bacterianos formulados con una especie son una alternativa para la agricultura actual, se ha invertido más una década para su estudio, desarrollo y aplicación, sin embargo, se evidenció que bajo ciertas condiciones ambientales como la escasez de agua, principal factor de estrés para el desarrollo vegetal; así como la variedad de la planta entre otros factores bióticos y abióticos, el resultado de la promoción del crecimiento vegetal al emplear estos inoculantes fue muy bajo ó nulo. Los inoculantes multi-especies podrían ser una alternativa para asegurar los resultados positivos en la promoción de crecimiento de plantas. Es importante mencionar, que ya existen estudios referentes a la formulación de inoculantes multi-especies, sin embargo, los consorcios más estudiados emplean dos géneros bacterianos y han sido probados en leguminosas, caña de azúcar, trigo entre otros.

Pocos estudios se han desarrollado sobre consorcios, de más de 3 géneros bacterianos, que estén enfocados a estimular el crecimiento vegetal del maíz, modelo vegetal de importancia agrícola en nuestro país, con aplicación alimenticia, industrial y cultural. Por lo planteado anteriormente se propone estudiar las relaciones antagónicas de bacterias con potencial PGPR, que presenten resistencia a la desecación, además de contar con mecanismos de promoción del crecimiento vegetal para la formulación de una mezcla bacteriana que estimule el crecimiento del maíz criollo azul, bajo condiciones de escasez de agua.

La formulación de este consorcio sentará las bases para la aplicación y estudio de la mezcla a nivel de campo; para brindar alternativas metodológicas a la práctica agrícola actual para obtener mejores rendimientos, que sean amigables con el ambiente, así como abaratar costos de producción, que impacten a favor del productor.

HIPÓTESIS

La formulación de un inoculante multi-especies con bacterias PGPR con capacidad de resistencia a la desecación y que pueden coexistir en un consorcio promoverá el crecimiento de maíz eficazmente bajo condiciones de escasez de agua y con hidratación adecuada.

OBJETIVO GENERAL

Seleccionar y evaluar la capacidad de diversas bacterias de interés agrícola para tolerar la desecación, con el fin de desarrollar un inoculante multi-especies destinado para su empleo en zonas áridas o de escasez de agua.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la co-existencia entre diversas especies bacterianas.
2. Estimar la tolerancia a la desecación de diversas bacterias de interés agrícola.
3. Diseñar un inoculante multi-especies que contenga cepas resistentes a la desecación.
4. Evaluar la promoción de crecimiento vegetal del maíz (criollo azul) cuando es aplicado el multi-inoculante bajo condiciones hidratadas, a nivel de invernadero.
5. Evaluar la promoción de crecimiento vegetal del maíz (criollo azul) cuando es aplicado el multi-inoculante bajo condiciones de desecación antes de la germinación, a nivel de invernadero.

MATERIAL Y MÉTODOS

ENSAYO DE ANTAGONISMO

Se realizó la metodología de agar en doble capa donde se probaron a todas las cepas como posibles productoras y como posibles indicadoras, la metodología se registró en: dx.doi.org/10.17504/protocols.io.j4mcqu6

ENSAYO DE DESECACIÓN

Las cepas se cultivaron hasta fase estacionaria, para alcanzar poblaciones de 1×10^9 CFU/mL, posteriormente, las bacterias fueron lavadas por centrifugación y se resuspendieron en el mismo volumen de agua destilada estéril, y réplicas de 500 μ l de la suspensión obtenida fueron dispensadas en tubos Eppendorf que se colocaron bajo condiciones para llevar a cabo la desecación extrema a 30° C, 50% de humedad relativa, el protocolo detallado está registrado en: dx.doi.org/10.17504/protocols.io.j4icque

Para cada ensayo se determinó la Tasa de supervivencia bacteriana (Bacterial Survival Ratio: BSR) la cual es la relación del logaritmo del número de células bacterianas presentes en la suspensión después del comienzo de la desecación (AbD) más uno entre el número de células viables antes de la desecación (BD), multiplicado por 100, es decir, $BSR = (\log AbD + 1 / \log BD) \times 100$ (Jesús Muñoz-Rojas, Fuentes-Ramírez, and Caballero-Mellado 2005). La BSR es un parámetro que nos permitió cuantificar la tolerancia a la desecación de las bacterias.

CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA *Acinetobacter* sp. EMM02.

El ADN de la cepa en cuestión se extrajo utilizando un kit de purificación de ADN genómico (PROMEGA). De cada muestra de ADN extraído, el gen que codifica para el RNA ribosomal 16S (16S rRNA) se amplificó mediante la técnica de PCR usando los oligonucleótidos universales fD1: 5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 y rD1: 5 - AAGGAGGTGATCCAGCC-3 (Weisburg et al. 1991), que amplifican casi la longitud completa del gen (1500 pb), con el reactivo Master MIX (Invitrogen). La amplificación se realizó como se describe en Morales-García et al., 2011 y se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa. El gen amplificado se purificó usando un kit de purificación de PCR (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El amplificado purificado se envió a secuenciar a la unidad de servicio de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. La secuencia obtenida se comparó en la base de datos pública NCBI mediante BLASTA y se depositó en la base de datos GenBank con el número de acceso KU686485.

COMPATIBILIDAD DE LAS CEPAS BACTERIANAS SELECCIONADAS PARA EL INOCULANTE MULTI-ESPECIES BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE CRECIMIENTO.

Las bacterias se cultivaron individualmente y en conjunto en medio líquido SYP y PY-Ca a 30 ° C y 200 rpm durante 120 horas; cada cultivo se generó por triplicado. El número de células cultivables se cuantificó en quintuplicado utilizando el método “Goteo por Sellado en Placa Masivo” (GSPM) (Corral-Lugo et al. 2012) con placas de medio selectivo para

identificar cualquier relación inhibidora entre las cepas co-inoculadas como se describe en trabajos previos (Jesús Muñoz-Rojas, Fuentes-Ramírez, and Caballero-Mellado 2005; Marín-Cevada *et al.* 2012).

INFLUENCIA DEL TIPO DE SUELO SOBRE LA RESISTENCIA A LA DESECACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS PARA FORMULAR LA MEZCLA BACTERIANA.

Se utilizaron dos tipos de suelos, colectados en dos zonas geográficas distintas: el suelo arenoso limoso fue colectado en Huejotzingo, Puebla México (19° 06'00'' N; 98° 20'00'' W) y el suelo arenoso fue colectado en Domingo Arenas, Puebla, México (19° 09'00'' N; 98° 96'00'' O). Las características fisicoquímicas de los suelos se determinaron como en estudios previos (Shahzad *et al.* 2013). Se obtuvo una suspensión bacteriana como se indica en la sección "Ensayos de desecación bacteriana", y se cuantificó el número de células cultivables en quintuplicado utilizando el método GSPM con placas de medio SYP. Para cada cepa, se llenaron treinta tubos Eppendorf estériles con 500 mg de suelo experimental más 500 µL de la suspensión bacteriana; se mezclaron vigorosamente y se cubrieron con tapones de algodón estéril. Se incluyeron tratamientos con 500 µL de suspensión bacteriana sin suelo para soporte. Todos los tubos se colocaron en una cámara de desecación a 30 °C y 55% de humedad relativa (HR). El agua en cada tubo se evaporó completamente 5 días después de colocar los tubos en la cámara de desecación. El recuento de células cultivables se realizó cada tres días durante un período de doce días utilizando el método MSDP. Para las muestras de 3 días posteriores al inicio de la desecación (Days After the Beginning of Desiccation DABD), se usaron cinco tubos para evaluar, ajustando el volumen de líquido de cada tubo a los 500 µL iniciales. Para las muestras completamente desecadas (6, 9 y 12 DABD), se agregaron 500 µL de agua a las células, y después de 40 minutos de agitación ocasional, se logró la rehidratación.

CARACTERÍSTICAS PARA PROMOVER EL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE LAS CEPAS SELECCIONADAS PARA FORMULAR EL INOCULANTE MULTI-ESPECIES.

La evaluación de la capacidad de solubilización de fosfatos de las cepas exploradas, se realizó en medio caldo Pikovskaya complementado, que contenía 5 g/L de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ después de 5 días de crecimiento del cultivo a 30 °C (Pikovskaya 1948; Gulati *et al.* 2009). Los compuestos de tipo indol se evaluaron utilizando el ensayo colorimétrico basado en el reactivo de Salkowski y utilizando el reactivo PC y medio K-lactato suplementado con triptófano (100 ppm) (Shahzad *et al.* 2014; Carreño-Lopez *et al.* 2000).

El contenido de sideróforos se determinó de acuerdo con el método rápido y universal que implica azulol S de cromo (CAS) con una técnica de superposición en la que un medio O-CAS modificado se coloca sobre placas de agar de cultivo (Pérez-Miranda *et al.* 2007). Las bacterias se cultivaron en placas de agar LB para 8 h a 30 °C, y luego una capa se trató con

30 ml de medio O-CAS sin nutrientes y se incubó a 30 °C durante 15 minutos. Posteriormente, se observó un cambio en el color de azul a naranja en torno al crecimiento de las cepas bacterianas productoras de sideróforos.

MEDIOS DE SELECCIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS DEL INOCULANTE MULTI-ESPECIE.

Para monitorear el comportamiento de las cepas en los diferentes experimentos fue necesario contar con medios de selección que permitieran el crecimiento de una cepa y discriminaran el crecimiento de las otras presentes en la misma mezcla o ambiente. Se exploraron distintas fuentes de carbono, diferentes concentraciones de antibióticos, metales pesados y se consideraron datos previamente obtenidos en el “Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana“ (Morales-García *et al.*, 2013). Los medios que en este trabajo permitieron una adecuada selección para las cepas del inoculante multi-especies propuesto se muestran en la tabla siguiente:

Cepas bacterianas	Medios de selección
<i>Azospirillum brasilense Sp7</i>	Rojo Congo- CRO
<i>Acinetobacter sp. EMM02</i>	BAC- CFX
<i>Sphingomonas sp. OF178</i>	LB 5%- AK
<i>Pseudomonas putida KT2440</i>	Citrato de Simons -Cm

Medio BAc: 0.2% Ácido azelaico, 0.02% Citrulina, 0.04% K₂HPO₄, 0.04% KH₂PO₄, y 0.02%, MgSO₄. 7H₂O), y 16g de agar/ H₂O L pH 5.7. CTX=cefotaxima 70 µg /ml.

Medio Rojo Congo: 0.5g K₂HPO₄, 0.2g MgSO₄. 7H₂O, 0.1 g NaCl, 0.5 g extracto de levadura, 0.015 g FeCl₃ 6 H₂O, 5g Ácido málico, 4.8g KOH, y 16g agar/ H₂O L. Cro=Ceftriaxona 100 µg /ml

Medio Luria Bertani modificado 5% AK: 0.5 g peptona de caseína, 0.25 g extracto de levadura, 0.25 g NaCl, y 16g de agar/ H₂O L. AK= amikacina 30 µg /ml.

Medio citrato de Simmons: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1g, K_2HPO_4 1g, NaCl 5g, $\text{NaH}_2(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO}))_3$ 2g, MgSO_4 0.02g, azul de bromotimol 0.08g y 16g de agar/ H_2O L. Cm= cloranfenicol 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

OBTENCIÓN DE MAÍZ AXÉNICO

Las semillas de maíz azul fueron esterilizadas superficialmente usando hipoclorito de sodio al 6.5% en acuerdo a trabajo previamente realizado (Morales-García *et al.* 2011). El maíz fue enjuagado 10 veces con agua destilada estéril en una campana de flujo laminar para mantener condiciones de esterilidad. Los maíces axénicos fueron usados para los ensayos de inoculación con bacterias.

OBTENCIÓN DE LA SUSPENSIÓN BACTERIANA PARA INOCULAR SEMILLAS DE MAÍZ

Las bacterias fueron crecidas en medio LB líquido a 30 °C durante 24 horas, pero algunas variantes de los medios y crecimiento son mencionadas y aclaradas en los resultados de los experimentos específicos. A partir del primer crecimiento se inoculó un matraz Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 100 ml de medio LB. Los cultivos fueron colocados en agitación a 200 rpm y 30 °C durante 24 horas para alcanzar una densidad máxima (fase estacionaria). El crecimiento bacteriano de los cultivos fue centrifugado a 4 °C durante 10 minutos a 5,000 rpm. El pellet obtenido fue re-suspendido en el mismo volumen inicial con agua destilada estéril, la suspensión resultante se diluyó en proporción 1:100 y el número de bacterias fue determinado por quintuplicado mediante el método de conteo denominado “Goteo por Sellado en Placa Masivo” (GSPM) (Corral-Lugo *et al.* 2012). La suspensión bacteriana sirvió para inocular 55 semillas para cada tratamiento ensayado: dos a 30 °C (inoculado y no inoculado) y dos a 40 °C (inoculado y no inoculado). Para ello, las semillas fueron sumergidas durante una hora, tiempo suficiente para que esta bacteria se adhiriera a la superficie de las semillas de maíz (Morales-García *et al.* 2011). Los controles consistieron en sumergir el mismo número de semillas axénicas en agua destilada estéril. Se consideraron tratamientos de inoculación con la mezcla de bacterias propuesta en caso de ser explorada esta posibilidad.

ENSAYOS DE DESECACIÓN DE SEMILLAS INOCULADAS

Ochenta y cinco semillas de cada tratamiento de inoculación se colocaron en placas de Petri que contenían papel de filtro estéril seco (Whatman No. 1). Las placas que contienen semillas se colocaron en una cámara de desecación a 30 °C, 55% de HR. El agua se perdió por completo a 1 DABD en estas condiciones. Cada tres días después del comienzo de la desecación, se extrajeron cinco semillas de la cámara de desecación. Cada uno se colocó en un tubo Falcon de 15 ml de capacidad que contenía 3 ml de agua estéril durante 2 h, y los

tubos se agitaron vigorosamente usando un agitador mecánico (vortex). El número de bacterias cultivables se cuantificó usando el método MSDP, y se calculó la BSR.

SEMBRADO DE LAS SEMILLAS, ADHESIÓN Y COLONIZACIÓN BACTERIANA

Tanto las semillas inoculadas como las no inoculadas, de cada tratamiento, fueron colocadas en macetas conteniendo 1L de vermiculita estéril; un soporte inerte ampliamente usado para evaluación de la colonización de bacterias en plantas (J. Muñoz-Rojas and Caballero-Mellado 2003; Rodríguez-Andrade *et al.* 2015). En cada maceta fue sembrada solo una semilla y posteriormente fueron regadas con 100 ml de solución MSJ (Rodríguez-Andrade *et al.* 2015) y agua destilada estéril. Las macetas fueron rotuladas para su identificación y se colocaron aleatoriamente bajo condiciones de invernadero, con fotoperiodo 16/8 luz/obscuridad, humedad relativa de 70 % y bajo dos condiciones diferentes de temperatura para el crecimiento de plantas: la primera fue a temperatura máxima de 30 °C durante el día y 20 °C en la noche. La segunda condición de crecimiento fue a una temperatura máxima de 40 °C durante el día y a 30 °C en la noche. Las plantas fueron regadas periódicamente a lo largo del experimento.

La adhesión de la bacteria fue evaluada 12 horas posteriores a la inoculación (Morales-García *et al.* 2011), para ello 5 semillas de cada tratamiento fueron extraídas de macetas independientes, cada una fue sumergida en 3 ml de agua destilada estéril y agitadas vigorosamente en vortex. La suspensión obtenida fue usada para cuantificar el número de bacterias que fueron capaces de adherirse a las semillas, para ello la suspensión fue diluída en factor 1:10 con agua destilada estéril y se usó el método de recuento GSPM mediante el sellado en placas de Petri con los medios de selección. Semillas de tratamientos sin inocular se procesaron de la misma forma.

La colonización de bacterias fue evaluada a los 15, 30 y 45 días posteriores a la inoculación (dpi). Para ello, cinco plantas de cada tratamiento (inoculadas y controles) fueron extraídas de sus macetas, la vermiculita fue sacudida y las raíces con vermiculita más adherida fueron sumergidas en suficiente agua destilada estéril, se agitó vigorosamente y la suspensión obtenida fue diluída en factor 1:10 (peso/volumen) para realizar el recuento de bacterias mediante el método GSPM. En este trabajo la vermiculita más adherida a las raíces fue considerada como suelo rizosférico y se consideró que la suspensión resultante contiene bacterias de la rizósfera, como se ha sugerido en otros trabajos (J. Muñoz-Rojas and Caballero-Mellado 2003; Morales-García *et al.* 2011; Rodríguez-Andrade *et al.* 2015). El peso de la vermiculita más adherida fue obtenido mediante el secado de las muestras sin las raíces a 70 °C durante 3 días y este valor fue considerado para ajustar el número de unidades formadoras de colonia por mililitro (No. UFC/ml) al número de unidades formadoras de colonia por gramo de vermiculita (No. UFC/g V) (Rodríguez-Andrade *et al.* 2015).

EVALUACIÓN DE LA ESTIMULACIÓN DE CRECIMIENTO

La capacidad de las cepas individuales y en consorcio para promover el crecimiento de plantas de maíz fue evaluada a los 45 dpi en 30 plantas para cada tratamiento. En este trabajo se midió el peso seco de las plantas, para ello, éstas fueron extraídas de las macetas y las raíces fueron lavadas con cuidado para eliminar la vermiculita. Después, las raíces fueron separadas de la región aérea y se colocaron en bolsas de papel de forma independiente con etiquetas del tratamiento correspondiente. Las muestras fueron colocadas en una estufa para su secado a 70 °C durante 20 días. Después de este tiempo las muestras fueron sacadas de la estufa y colocadas a temperatura ambiente para pesarlas en una balanza analítica. Las mediciones fueron realizadas en 30 plantas para cada tratamiento. Los datos del peso seco fueron analizados de forma pareada usando la prueba *t*-student a una $P \leq 0.05$ mediante el programa Sigma Plot de Handel scientific Software. Cuando hubo diferencias estadísticas los tratamientos fueron marcados con letras diferentes.

COMPROBACION DE LA IDENTIDAD DE LAS CEPAS AISLADAS DE PLANTAS.

La comprobación se realizó usando métodos moleculares que incluyeron la extracción de ADN genómico, amplificación de genes que codifican para el 16S RNAr y patrones de restricción. El ADN de la cepa se extrajo utilizando un kit de purificación de ADN genómico (PROMEGA). De cada muestra de ADN extraído, el gen que codifica para el 16S rRNA se amplificó mediante PCR usando los oligonucleótidos universales fD1: 5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 y rD1: 5 - AAGGAGGTGATCCAGCC-3 (Weisburg et al. 1991), que amplifican casi la longitud completa del gen 16S rRNA (1500 pb), con el reactivo Master MIX (Invitrogen). La amplificación se realizó como se describe en (Y.E. Morales-García et al. 2011). La amplificación por PCR se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa, y el gen amplificado se purificó usando un kit de purificación de PCR (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El amplificado purificado se envió a secuenciar.

Para cada cepa de referencia y cepa aislada de la rizósfera, el gen amplificado que codifica 16S rRNA se digirió con 5 U de diferentes enzimas de restricción (*AluI*, *HhaI*, *HinfI*, *RsaI*, *MboI* y *MspI*). Las longitudes de los fragmentos de restricción generados para cada cepa probada se determinaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% usando un marcador comercial de peso molecular (escala de ADN de 100 pb), y los patrones de las cepas aisladas se compararon con los de cepas de referencia inoculadas inicialmente (Bogino et al. 2013).

RESULTADOS

Ensayos de antagonismo para la selección de cepas compatibles

Se exploraron 25 cepas bacterianas pertenecientes a los géneros: *Azospirillum*, *Acinetobacter*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Paraburkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Sphingomonas*, con estas cepas se desarrollaron ensayos de antagonismo, mediante el método de agar en doble capa (Tabla S1 del artículo Molina-Romero *et al.*, 2017, mostrado más adelante). Se observó que las bacterias *Sphingomonas* sp. DS204, *Sphingomonas* sp. DS201, *Sphingomonas* sp. GOF203, *Acinetobacter* sp. EMM02, *P. putida* KT2440, *P. putida* DOT-T1E, *Enterobacter* sp. UAPSO3001 (Tabla 1) (Molina-Romero, Baez, *et al.* 2017), fueron inhibitorias del crecimiento de otras bacterias; sin embargo, podrían coexistir con algunas bacterias probadas en este trabajo. Diecisiete cepas no mostraron efecto inhibitorio con la mayoría de los microorganismos ensayados por lo que fueron consideradas como capaces de coexistir en formulaciones multiespecies. En contraparte, *Rhizobium* sp. MS24 y *Bradyrhizobium* sp. MS13 fueron inhibidas por 5 y 7 cepas bacterianas respectivamente. *Sphingomonas* sp. DS204 mostró una alta eficiencia antagónica en contra de otros géneros bacterianos, inhibiendo 19 cepas, excepto a ella misma a *P. unamae* MTL-641 y a bacterias pertenecientes al género de *Sphingomonas* (DS201, GOF202, OF178, Ans290).

Bradyrhizobium sp. MS13, *Rhizobium* sp. MS24 and *Sphingomonas* sp. DS204 no fueron consideradas para la evaluación de la tolerancia a la desecación por su sensibilidad o por su elevada capacidad inhibitoria observada, debido a que estas características son incompatibles para la formulación de un consorcio bacteriano, objetivo principal de este trabajo. Algunas cepas fueron capaces de coexistir sin mostrar efecto antagónico sobre el crecimiento de otras cepas bacterianas exploradas.

Ensayos de desecación

Las diecisiete cepas capaces de coexistir fueron evaluadas en su capacidad para resistir a la desecación. Las cepas mostraron diferentes niveles de resistencia al estrés por desecación por un periodo de 12 días posterior al inicio de la desecación (DABD, por sus siglas en inglés: After the beginning of desiccation). Nuestros resultados mostraron cepas altamente resistentes a la desecación (*A. brasilense* Sp7, *Acinetobacter* sp. EMM02, y *Sphingomonas* sp. OF178), otras fueron medianamente tolerantes (*Sphingomonas* sp. GOF203, *P. putida* KT2440 and *Bradyrhizobium* sp. MS23) y otras fueron sensibles a la desecación (*B. tropica* and *B. unamae* ScCu23) (Tabla 2) (Molina-Romero, Baez, *et al.* 2017).

Con base a los resultados de la tabla 1 y 2, algunas cepas pudieron seleccionarse para formular un consorcio (mezcla bacteriana). Se tomaron tres criterios para la formulación de

la mezcla bacteriana: su capacidad de coexistir, su resistencia a la desecación y sus características potenciales como PGPR. Este último criterio de selección fue inicialmente respaldado con la literatura reportada (Gulati *et al.* 2009; Rojas-Tapias *et al.*, 2014; Planchamp *et al.* 2014). De esta forma cuatro cepas fueron escogidas para la formulación de la mezcla bacteriana *A. brasilense* Sp7, *Acinetobacter* sp. EMM02, *Sphingomonas* sp. OF178 y *P. putida* KT2440. Otras mezclas bacterianas cumplen con estos criterios, sin embargo, la capacidad experimental en este trabajo no pudo cubrir todas esas posibilidades. De hecho, en este trabajo se formuló otra mezcla con 5 géneros bacterianos *A. brasilense* Sp7, *Acinetobacter* sp. EMM02, *Sphingomonas* sp. OF178, *Enterobacter* sp. UAPSO3001 y *P. putida* KT2440, que cumplió criterios establecidos, pero después de realizar los ensayos de promoción del crecimiento vegetal, se observó que las plantas inoculadas con la mezcla bacteriana redujeron hasta un 60 % el porcentaje de germinación en comparación a las plantas control (semillas no inoculadas) y a las plantas mono-inoculadas, por lo que estos estudios no fueron publicados.

Es importante mencionar que la cepa *Acinetobacter* sp. EMM02 fue caracterizada molecularmente durante el desarrollo de este trabajo. Se secuenció y analizó el gen que codifica el 16S RNAr para corroborar el género bacteriano Fig.S1 y Tabla S2.

1. Compatibilidad de las cepas bacterianas seleccionadas para el inoculante multi-especies bajo diferentes condiciones de crecimiento.

La validación de la compatibilidad de las cepas seleccionadas para la formulación de la mezcla bacteriana se realizó con curvas de crecimiento de las cuatro cepas de forma conjunta y forma individual en diferentes condiciones de crecimiento, en donde se probaron dos medios de cultivos PY-Ca y SYP (S2 Fig.). Las cuatro cepas crecieron eficientemente en forma individual y en co-cultivo en ambos medios de cultivo, corroborando que no se realizan relaciones antagónicas entre las cuatro cepas de la mezcla bacteriana, independientemente de las condiciones de cultivo exploradas.

Características para promover el crecimiento de plantas de las cepas seleccionadas para formular el inoculante multiespecies.

Las cuatro cepas seleccionadas para formular un inoculante multi-especies fueron capaces de producir índoles totales, sideróforos, así como poseer la capacidad de la solubilizar fosfatos, en condiciones *in vitro* (Tabla 4 y Figura 2 del artículo de (Molina-Romero, Baez, *et al.* 2017).

2. Influencia del tipo de suelo sobre la resistencia a la desecación de las cepas seleccionadas para formular la mezcla bacteriana.

Para determinar si el tipo de suelo afecta el comportamiento de la resistencia a la desecación de las cepas seleccionadas para formular el inoculante multiespecies, se

probaron dos tipos de suelos colectados de dos zonas geográficas diferentes. En acuerdo con los resultados los suelos fueron clasificados como arenoso y arenoso limoso (Fig. S3) (Molina-Romero, Baez, *et al.* 2017). La composición fisicoquímica de los dos soportes fue analizada, la diferencia más notable fue que la cantidad de materia orgánica fue mayor en el suelo arenoso limoso en comparación al suelo arenoso (Fig.S3). *Acinetobacter* sp. EMM02 presentó una elevada resistencia a la desecación independiente del tipo de suelo y presentando el mismo comportamiento que en agua. La supervivencia a la desecación de *A. brasilense* Sp7, *P. putida* KT2440 y *Sphingomonas* sp. OF178 en suelo arenoso fue menor en comparación al suelo arenoso limoso y al control agua. Por otra parte *A. brasilense* Sp7 y *Sphingomonas* sp. OF178 presentaron un comportamiento similar de resistencia a la desecación en suelo limoso arenoso y en control agua (Fig 1) (Molina-Romero, Baez, *et al.* 2017).

Evaluación de la promoción de crecimiento de las cepas seleccionadas para formular el inoculante multiespecies.

Debido a que las cepas *A. brasilense* Sp7, *P. putida* KT2440 y *Sphingomonas* sp. OF178 y *Acinetobacter* sp. EMM02 fueron capaces de coexistir entre ellas, mostraron una elevada resistencia a la desecación y un alto potencial PGPR *in vitro*, tanto en forma individual como en mezcla bacteriana, en este trabajo se evaluó la capacidad de promoción del crecimiento vegetal de la mezcla bacteriana en semillas de maíz azul cuando fueron inoculadas en mono-inoculación y en mezcla bacteriana o consorcio (mezcla de las cuatro cepas). Para ello, después de a la inoculación de las semillas, éstas se sometieron a tres condiciones experimentales:

Experimento 1

Semillas de maíz inoculado con 5 cepas bacterianas en forma individual y en consorcio, bajo condiciones estresantes de crecimiento de las plantas a 45° C.

Experimento 2

Maíz inoculado con 4 cepas bacterianas en forma individual y en consorcio, bajo condiciones de hidratación óptima antes y después de la germinación.

Experimento 3

Maíz inoculado con 4 cepas bacterianas en forma individual y en consorcio, bajo condiciones de desecación antes de la germinación.

RESULTADOS DEL EXPERIMENTO 1: Crecimiento de maíz inoculado con 5 cepas bacterianas en forma individual y en consorcio, bajo condiciones sin estrés por temperatura (25-30 °C) y con estrés de temperatura (35-45 °C).

Resultados de la Mezcla bacteriana formulada con 5 cepas bajo condiciones de crecimiento del maíz a 25-30° C.

De acuerdo a los resultados de antagonismo y tolerancia a la desecación de las 17 cepas que pueden co-existir, inicialmente se eligieron a *Enterobacter* sp. UAPSO3001, *P. putida* KT2440, *A. brasilense* Sp7, *Acinetobacter* EMM02 y *Sphingomonas* sp. OF178 para la formulación de la mezcla bacteriana debido a su potencial para promover el crecimiento del maíz azul.

El número de bacterias fue cuantificado para las suspensiones individuales y en la mezcla, con estas suspensiones se realizó la inoculación de las semillas de maíz. La población bacteriana de las cinco cepas osciló entre los órdenes de 10^5 a 10^8 UFC/ml tanto en inoculación independiente como en mezcla.

Se evaluó la adhesión de las bacterias a las semillas de maíz, en forma individual y en consorcio bacteriano. Los resultados que observamos sugieren una adecuada adhesión de las cinco cepas de la mezcla a las semillas, en mono-inoculación y en mezcla, que corresponde a poblaciones de 10^5 a 10^8 UFC/semilla (Tabla E1).

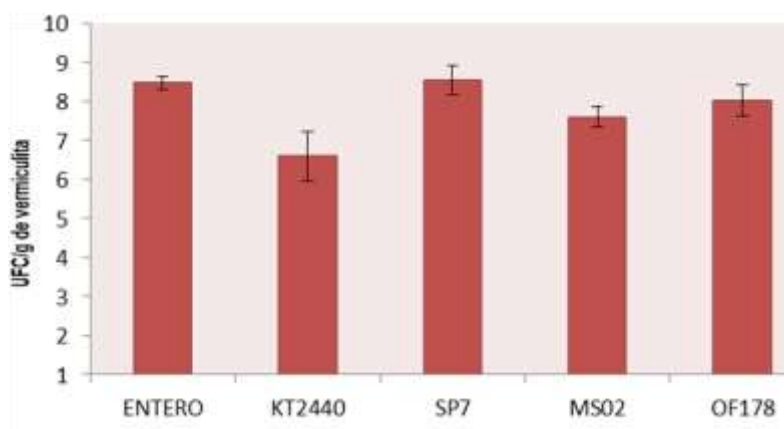
Otro parámetro evaluado fue la colonización bacteriana tanto en forma individual y en consorcio, donde los resultados obtenidos sugieren una eficiente colonización de las 5 cepas en consorcio con una tendencia similar en condiciones individuales (Gráfica E1).

Tabla E1. Adhesión de las cinco cepas del consorcio a semillas de maíz

Tratamiento de inoculación	*Log UFC/semilla	** Log UFC /semilla
<i>A. brasilense</i> Sp7	5.15 ±0.51	4.73 ±0.36
Consorcio Sp7	7.86 ±0.28	7.51 ±0.34
<i>P. putida</i> KT2440	7.10 ±0.19	7.2 ±0.32
Consorcio KT2440	5.24 ±0.27	5.50 ±0.45
<i>Acinetobacter</i> sp. EMM02	7.17 ±0.30	7.59 ±0.21
Consorcio EMM02	7.18 ±0.35	7.42 ±0.35
<i>Sphingomonas</i> sp. OF178	7.05 ±0.33	7.35 ±0.36
Consorcio OF178	6.5 ±0.36	6.9 ±0.31
<i>Enterobacter</i> sp. UAPSO3001	8.5 ±0.33	8.65 ±0.36
Consorcio UAPSO3001	8.1 ±0.36	7.9 ±0.31

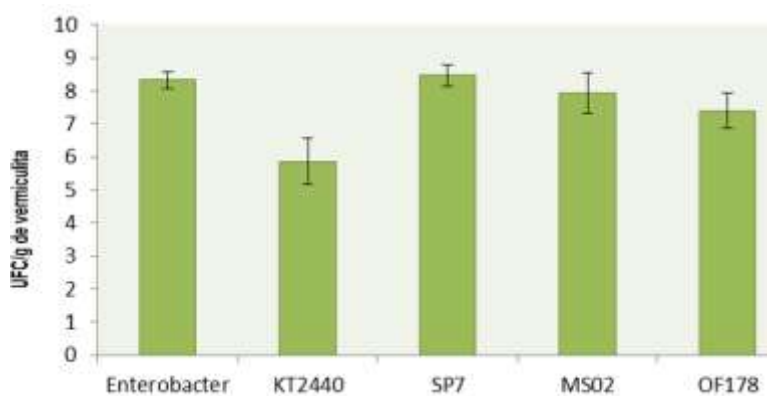
Determinación de la población bacteriana adherida a la superficie semilla (Log de UFC/ml) cada valor es el promedio de cinco repeticiones independientes con su respectiva desviación estándar, realizado por el método de MSDP en medio selectivo para cada cepa. * Experimento con crecimiento de las plantas sin estrés por temperatura (. ** Experimento con crecimiento de las plantas con estrés por temperatura 35-45 °C. Semillas no inoculadas no presentaron crecimiento bacteriano.

Gráfica E1. Colonización cepas independientes (25-30 °C)



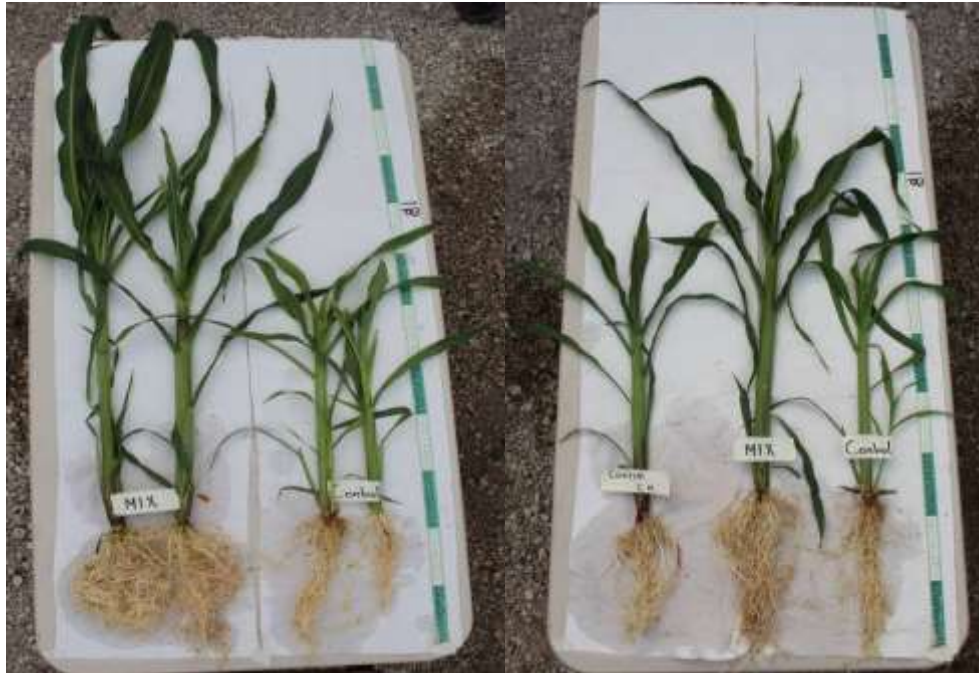
Colonización de las cinco cepas a las raíces de plantas a los 45 días posteriores a la inoculación. Barra ENTERO: *Enterobacter* sp. UAPSO3001, barra KT2440: *P. putida* KT2440, barra SP7: *A. brasilense* Sp7, Barra MS02: *Acinetobacter* EMM02; barra OF178: *Sphingomonas* sp. OF178.

Gráfica E2. Colonización del consorcio (25-30 °C)



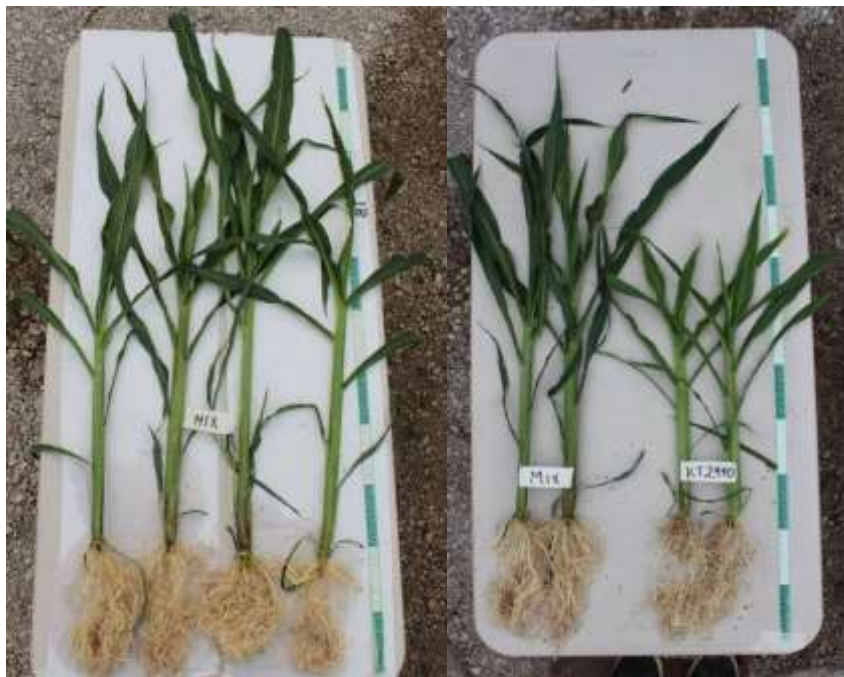
Colonización de las cinco cepas a las raíces de plantas a los 45 días posteriores a la inoculación. Barra Enterobacter: *Enterobacter* sp UAPSO3001, barra KT2440: *P. putida* KT2440, barra SP7: *A. brasilense* Sp7, Barra MS02: *Acinetobacter* EMM02; barra OF178: *Sphingomonas* sp. OF178.

Imagen A. Comparación de plantas inoculadas y sin inocular (control), crecidas sin estrés (25-35 °C)



MIX: plantas inoculadas con consorcio bacteriano; Control: plantas sin inoculación.

Imagen B. Comparación de plantas inoculadas, con una sola cepa y en consorcio, crecidas sin estrés (25-35 °C)



MIX: plantas inoculadas con consorcio bacteriano; KT2440: plantas inoculadas con *Pseudomonas putida*.

Imagen C. Comparación de plantas inoculadas, con una sola cepa y en consorcio, crecidas sin estrés (25-35 °C)



MIX: plantas inoculadas con consorcio bacteriano; Sp7: plantas inoculadas con *Azospirillum brasilense*.

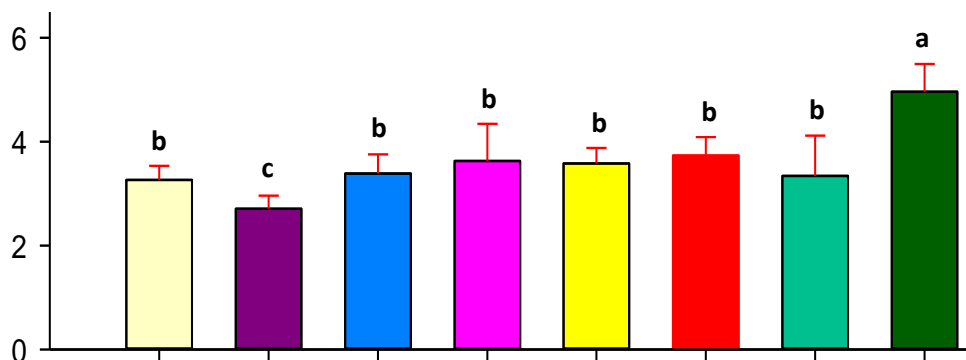
Imagen D. Comparación de plantas inoculadas, con una sola cepa y en consorcio, crecidas sin estrés (25-35 °C)



MIX: plantas inoculadas con consorcio bacteriano; OF178: plantas inoculadas con *Sphingomonas* sp. 178; MS02: plantas inoculadas con *Acinetobacter* sp. EM02.

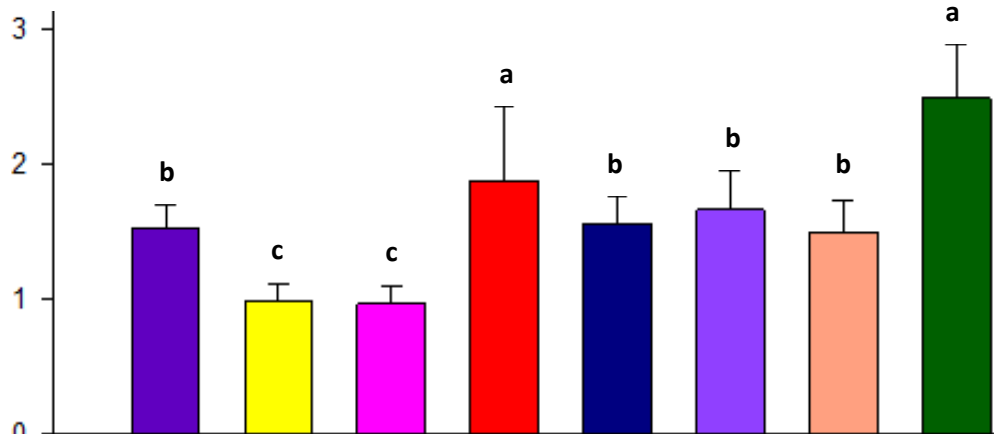
La promoción del crecimiento vegetal fue evidenciada mediante la evaluación de peso seco de la parte aérea y de la raíz (Imagen A - D), con estos resultados podemos sugerir que la inoculación individual con las bacterias *Enterobacter* sp UAPSO3001, *P. putida* KT2440, *A. brasilense* Sp7, *Acinetobacter* EMM02 y *Sphingomonas* sp. OF178 promueven el crecimiento del maíz en comparación a las plantas control; sin embargo, es superior la estimulación del crecimiento vegetal cuando el maíz es inoculado con el consorcio bacteriano en comparación a la mono-inoculación (Gráficas E3 y E4; Imagen B - D).

Gráfica E3. Peso seco Parte Aérea



Peso en gramos de la parte aérea de las plantas a los 45 días posteriores a la inoculación. Barra amarilla: control, barra morada: control inoculado con consorcio esterilizado, barra azul: *A. brasilense* Sp7, barra rosa: *Enterobacter* sp., barra amarilla: *P. putida* KT2440; barra naranja: *Sphingomonas* sp. OF178; barra verde turquesa: *Acinetobacter* EMM02; barra verde: consorcio con cinco cepas. Cada barra representa la media de treinta y cinco determinaciones independientes y la respectiva desviación Estándar. Barras con letras idénticas no presentan diferencia estadísticamente significativa a $p \leq 0.05$ analizado con *t*-Student.

Gráfica E4. Peso seco Raíz



Peso en gramos de las raíces de las plantas a los 45 días posteriores a la inoculación. Barra morada: control, barra amarilla: control inoculado con consorcio esterilizado, barra rosa: *A. brasilense* Sp7, barra naranja: *Enterobacter* sp., barra azul: *P. putida* KT2440; barra lila: *Sphingomonas* sp. OF178; barra melón: *Acinetobacter* sp. EMM02; barra verde: consorcio con cinco cepas. Cada barra representa la media de treinta y cinco determinaciones independientes y la respectiva desviación Estándar. Barras con letras idénticas no presentan diferencia estadísticamente significativa a $p \leq 0.05$ analizado con *t*-Student.

Promoción del crecimiento vegetal empleando un consorcio formulado con 5 cepas bacterianas bajo condiciones estresantes de crecimiento del maíz a 35-45°

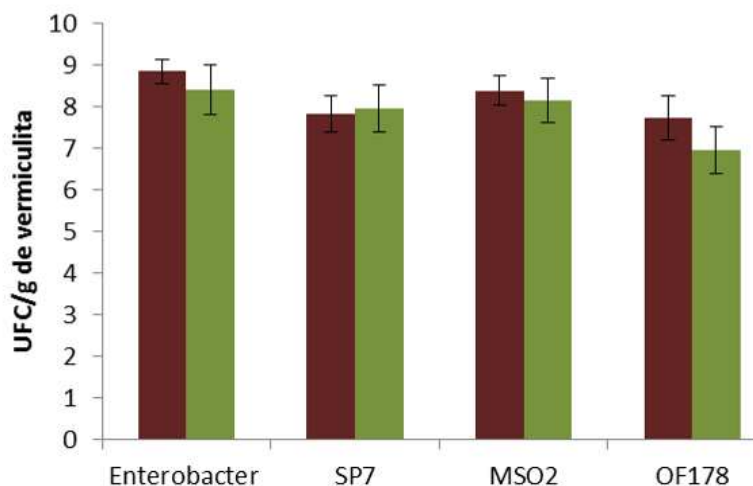
Al igual que en el ensayo anterior, se determinó la población celular en las suspensiones bacterianas tanto en forma individual como en consorcio, obteniendo números de bacterias similares al experimento anterior (10^5 a 10^8 UFC/ml).

También se determinó la adhesión bacteriana a las semillas, con resultados similares al experimento inicial, reportado en la Tabla E1.

La colonización de *P. putida* no fue observada a los 45 días posteriores a la inoculación en las plantas inoculadas con esta bacteria de forma individual y en consorcio, no se recuperaron células cultivables en condiciones de laboratorio a partir de las raíces de las plantas. Gráfica E5.

Por otra parte, la colonización de las cepas *Enterobacter* sp UAPSO3001, *A. brasilense* Sp7, *Acinetobacter* EMM02 y *Sphingomonas* sp. OF178 fue muy similar al experimento donde las plantas inoculadas crecieron sin estrés por altas temperaturas (Gráfica E5).

Gráfica E5. Colonización de las raíces del maíz con 5 cepas bacterianas bajo condiciones de crecimiento de las plantas a 35-45°

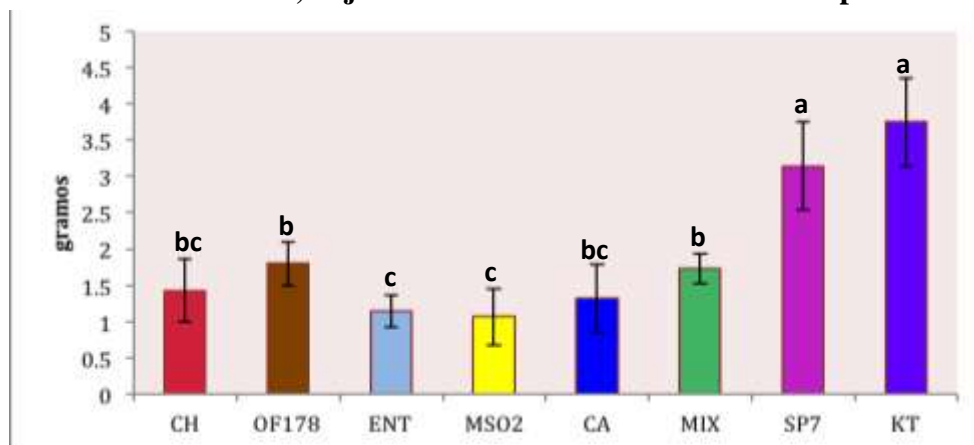


Colonización de las cuatro cepas a las raíces de plantas de 45 días posteriores a la inoculación. Barras en color vino: cepas individuales, barras en verde: cepas en consorcio. Barra ENTERO: *Enterobacter* sp, barra SP7: *A. brasilense* Sp7, barra MSO2: *Acinetobacter* EMM02; barra OF178: *Sphingomonas* sp. OF178.

Interesantemente, al determinar el peso seco de la parte aérea y la raíz no se observa promoción del crecimiento vegetal cuando las semillas son inoculadas con el consorcio, la cepa *Enterobacter* sp UAPSO3001 y *Acinetobacter* EMM02, en comparación a las plantas control (Gráfica E6). Por el contrario, si se registró mayor parte aérea y raíz de las plantas mono-inoculadas con *P. putida* KT2440, *A. brasilense* Sp7 y *Sphingomonas* sp. OF178,

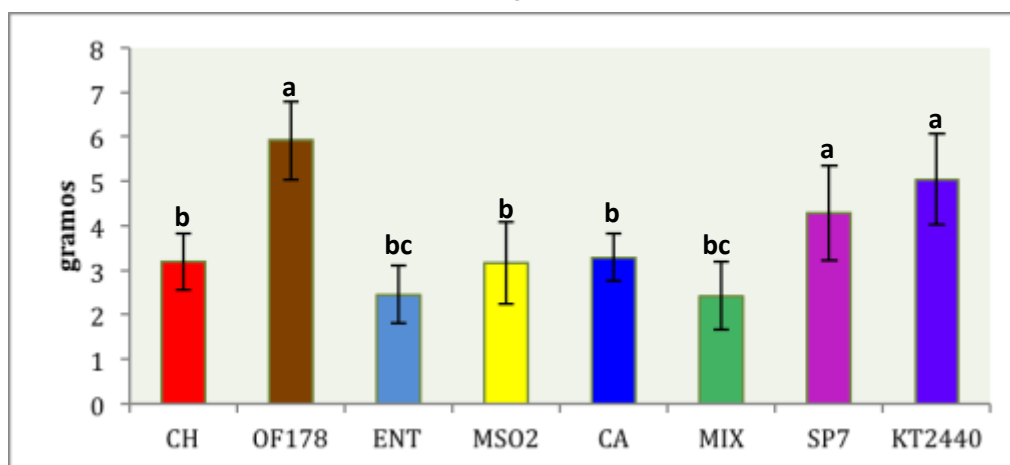
aun cuando las plantas son sometidas a condiciones de crecimiento estresantes por altas temperaturas.

Gráfica E6. Peso seco raíz, bajo condiciones de crecimiento de las plantas a 35-45°



Peso en gramos de las raíces de las plantas a los 45 días posteriores a la inoculación. Barra roja: control; barra café: *Sphingomonas* sp. OF178; barra azul: *Enterobacter* sp. UAPSO3001; barra amarilla: *Acinetobacter* sp. EMM02; barra azul rey: control inoculado con consorcio esterilizado, barra verde: consorcio con cinco cepas; barra rosa: *A. brasilense* Sp7; barra morada: *P. putida* KT2440. Cada barra representa la media de treinta y cinco determinaciones independientes y la respectiva desviación Estándar. Barras con letras idénticas no presentan diferencia estadísticamente significativa a $p \leq 0.05$ analizado con *t*-Student.

Gráfica E7. Peso seco parte aérea, bajo condiciones de crecimiento de las plantas a 35-45°



Peso en gramos de la parte aérea de las plantas a los 45 días posteriores a la inoculación. Barra roja: control; barra café: *Sphingomonas* sp. OF178; barra azul: *Enterobacter* sp. UAPSO3001; barra amarilla: *Acinetobacter* sp. EMM02; barra azul rey: control inoculado con consorcio esterilizado, barra verde: consorcio con cinco cepas; barra rosa: *A. brasilense* Sp7; barra morada: *P. putida* KT2440. Cada barra representa la media de treinta y cinco determinaciones independientes y la respectiva desviación Estándar. Barras con letras idénticas no presentan diferencia estadísticamente significativa a $p \leq 0.05$ analizado con *t*-Student.

Se destaca que el análisis de los resultados del experimento 1, *P. putida* KT2440, mostró una alta capacidad de promover el crecimiento de plantas de maíz bajo condiciones de estrés por temperatura y representó conocimiento novedoso para los estudios de interacción bacteria-planta, lo que motivó la publicación del artículo: (Molina-Romero, Morales-García, et al. 2017).

Pseudomonas putida estimula el crecimiento de maíz en función de la temperatura

Dalia Molina-Romero^{1,2}, Yolanda-Elizabeth Morales-García^{1,2}, Ana-Laura Hernández-Tenorio¹, Miguel Castañeda-Lucio³, Alma-Rosa Netzahuatl-Muñoz⁴ y Jesús Muñoz-Rojas¹
Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias¹, Escuela de Biología², Laboratorio de Genética Molecular Microbiana³, Laboratorio de Biotecnología⁴
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla^{1,2,3}, Universidad Politécnica de Tlaxcala⁴
Puebla, Pue.^{1,2}; Tepetitla, Tlax.³; México
molinardalia@gmail.com, ana4_56@hotmail.com, almarosa.netzahuatl@uptlax.edu.mx,
miguel.castaneda@correo.buap.mx, lissiamor, joymerre@yahoo.com.mx

Abstract— *Pseudomonas putida* KT2440 is a bacterium able to colonize plant roots and degrade toxic compounds from environment. The aim of present work was to evaluate the ability of this bacterium to promote the growth of autochthonous blue maize under two conditions of temperature: 30 and 40 °C. In this work we observed that the evaluated bacterium promoted the growth of maize in dependency of the temperature of plant development, with higher stimulation at 40 °C. We propose that this bacterium could protect the development of plants under stress conditions provoked by higher temperatures prevalent in agricultural fields of tropical or arid areas.

Keywords— *Pseudomonas putida*, Plant growth promoting rhizobacteria, temperature.

Resumen— *Pseudomonas putida* KT2440 es una bacteria con la capacidad de degradar compuestos tóxicos para el ambiente y coloniza eficientemente a las raíces de las plantas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la habilidad de esta bacteria para promover el crecimiento de maíz azul bajo dos condiciones de temperatura: 30 y 40 °C. En este trabajo se observó que esta bacteria es capaz de estimular el crecimiento del maíz en dependencia de la temperatura de desarrollo de las plantas, habiendo una mejor estimulación a 40 °C. Se propone que esta bacteria podría proteger a las plantas de las condiciones de estrés generados por elevadas temperaturas que ocurren en campos agrícolas de zonas tropicales o áridas.

Palabras claves— *Pseudomonas putida*, Rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas, temperatura.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se han estudiado las capacidades de diversas bacterias para promover el crecimiento de plantas por ser una alternativa ecológica que podría disminuir el uso de agroquímicos en los campos de cultivo [1, 2]. Se han seleccionado bacterias benéficas que interactúan bien con plantas para el desarrollo de inoculantes destinados para la agricultura [3, 4] y muchos de esos inoculantes han incrementado el rendimiento de los cultivos de forma exitosa. Por ejemplo, las formulaciones con *Azospirillum brasilense* han sido exitosas en casi un 70% con referencia a los sitios donde se han aplicado [5]. Sin embargo, otras bacterias como *Pseudomonas* spp. no han tenido resultados de éxito tan constantes en la promoción de crecimiento. En muchas ocasiones esta falta de éxito se ha atribuido a que las bacterias no son capaces de colonizar efectivamente a las plantas debido a que la población indígena es más competitiva que la inoculada [6]. No obstante, varios factores podrían estar involucrados y algunos de ellos han sido estudiados, por ejemplo, el acarreador del inoculante, aspectos de aplicación tecnológica, el tipo de suelo, la variedad de planta, el genotipo de bacteria usada, entre otros [7, 8, 9]. Otros factores como la temperatura, la humedad relativa y el fotoperíodo en el que se desarrollan las plantas son factores aun no estudiados en relación con la capacidad de bacterias para promover el crecimiento de plantas. Razón por la que se considera que aún se requieren estudios que indiquen cuáles son las condiciones en las que una bacteria va a ser capaz o no de realizar la estimulación efectiva del crecimiento para plantas inoculadas.

Pseudomonas putida KT2440 es una bacteria muy estudiada por sus capacidades de llevar a cabo la degradación de compuestos tóxicos y su alta tolerancia a compuestos aromáticos [10, 11, 12]. Esta bacteria es una cepa derivada de *Pseudomonas putida* PWWO; la cual alberga al plásmido TOL (iniciales que refieren a la degradación de tolueno) implicado en el catabolismo de tolueno y xileno mediante las vías de toluato y xilato [13]. La cepa KT2440 se diferencia de la PWWO porque ya no contiene el plásmido TOL. A pesar de ello, aún es capaz de usar compuestos aromáticos como fuente de carbono y tolerar compuestos altamente recalcitrantes [11, 14], lo que muestra que también su genoma contiene información importante para la degradación de compuestos. El genoma de esta bacteria se conoce y ha mostrado varias potencialidades de la bacteria [15], muchas de ellas que aún no han sido estudiadas. Además esta bacteria no es patógena, razón por la que se ha certificado como biosegura [13, 16].

Por otro lado *P. putida* KT2440 es capaz de colonizar a la rizósfera de diversas plantas entre las que destaca el maíz [17, 18]. La alta capacidad para tolerar tóxicos orgánicos y su excelente colonización de plantas, hacen que la cepa KT2440 sea un excelente modelo para potenciar la rizorremediación de compuestos en suelos contaminados [19]. Además, se ha observado que esta bacteria desencadena una respuesta sistémica inducida (ISR, de sus siglas en inglés) en plantas de *Arabidopsis thaliana* [20] y maíz [21], que las protege contra patógenos y este mecanismo podría significar una manera para estimular su crecimiento [22]. Sin embargo, aún no se ha demostrado que *P. putida* KT2440 sea una bacteria que estimule el crecimiento de plantas. Por esta razón el objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de *P. putida* KT2440 para promover el crecimiento de maíz azul criollo bajo dos condiciones de temperatura máxima para el crecimiento de las plantas: 30 °C y 40 °C. En este trabajo se mostró que esta bacteria tiene la capacidad para estimular el crecimiento del maíz, pero este estímulo es dependiente de la temperatura en la que se desarrollan las plantas.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

A. Obtención de maíz axénico

Las semillas de maíz azul fueron esterilizadas superficialmente usando hipoclorito de sodio al 6.5% en acuerdo a trabajo previamente realizado [23]. El maíz fue enjuagado 10 veces con agua destilada estéril en una campana de flujo laminar para mantener condiciones de esterilidad. Los maíces axénicos fueron usados para los ensayos de inoculación con bacterias.

B. Obtención de la suspensión bacteriana para inocular semillas de maíz

La bacteria usada en este trabajo fue donada por el grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos, Departamento de Protección Ambiental, Estación Experimental del Zaidín Granada, España. Esta cepa crece en medio LB adicionado con cloranfenicol a una concentración de 100 microgramos por mililitro (LB-Cm¹⁰⁰) [24].

La bacteria fue crecida en 5 ml de medio LB-Cm¹⁰⁰ líquido a 30 °C durante 24 horas y a partir de este crecimiento se inoculó un matraz conteniendo 100 ml de medio LB-Cm¹⁰⁰. Los cultivos fueron colocados en agitación a 200 rpm y 30 °C durante 24 horas para alcanzar una densidad máxima de crecimiento de 5 (fase estacionaria). El crecimiento bacteriano de los cultivos fue centrifugado a 4 °C durante 10 minutos a 5,000 rpm. El pellet obtenido fue resuspendido en el mismo volumen inicial con agua destilada estéril, la suspensión resultante se diluyó en proporción 1:100 y el número de bacterias fue determinado por quintuplicado mediante el método de conteo denominado "Goteo por Sellado en Placa Masivo" (GSPM) [25]. La suspensión bacteriana sirvió para inocular 55 semillas para cada tratamiento ensayado: dos a 30 °C (inoculado y no inoculado) y dos a 40 °C (inoculado y no inoculado). Para ello, las semillas fueron sumergidas durante una hora, tiempo suficiente para que esta

bacteria se adhiere a las semillas de maíz [23]. Los controles consistieron en sumergir el mismo número de semillas axénicas en agua destilada estéril.

C. *Sembrado de las semillas, adhesión y colonización bacteriana*

Tanto las semillas inoculadas como las no inoculadas, de cada tratamiento, fueron colocadas en macetas conteniendo 1L de vermiculita estéril: un soporte inerte ampliamente usado para evaluación de la colonización de bacterias en plantas [9, 26]. En cada maceta fue sembrada solo una semilla y posteriormente fueron regadas con 100 ml de solución MSJ [26] y agua destilada estéril. Las macetas fueron rotuladas para su identificación y se colocaron aleatoriamente bajo condiciones de invernadero, con fotoperiodo 16/8 luz/obscuridad, humedad relativa de 70 % y bajo dos condiciones diferentes de temperatura para el crecimiento de plantas: la primera fue a temperatura máxima de 30 °C durante el día y 20 °C en la noche. La segunda condición de crecimiento fue a una temperatura máxima de 40 °C durante el día y a 30 °C en la noche. Las plantas fueron regadas periódicamente a lo largo del experimento.

La adhesión de la bacteria fue evaluada 12 horas posteriores a la inoculación [23], para ello 5 semillas de cada tratamiento fueron extraídas de macetas independientes, cada una fue sumergida en 3 ml de agua destilada estéril y agitadas vigorosamente en vortex. La suspensión obtenida fue usada para cuantificar el número de bacterias que fueron capaces de adherirse a las semillas, para ello la suspensión fue diluida en factor 1:10 con agua destilada estéril y se usó el método de recuento GSPM mediante el sellado en placas de Petri con medio LB-Cm¹⁰⁰. Semillas de tratamientos sin inocular se procesaron de la misma forma.

La colonización de bacterias fue evaluada a los 15, 30 y 45 días posteriores a la inoculación (dpi). Para ello, cinco plantas de cada tratamiento (inoculadas y controles) fueron extraídas de sus macetas, la vermiculita fue sacudida y las raíces con vermiculita más adherida fueron sumergidas en suficiente agua destilada estéril, se agitó vigorosamente y la suspensión obtenida fue diluida en factor 1:10 (peso/volumen) para realizar el recuento de bacterias mediante el método GSPM. En este trabajo la vermiculita más adherida a las raíces fue considerada como suelo rizosférico y se consideró que la suspensión resultante contiene bacterias de la rizósfera, como se ha sugerido en otros trabajos [9, 23, 26]. El peso de la vermiculita fue obtenido mediante el secado de las muestras sin las raíces a 70 °C durante 3 días y este valor fue considerado para ajustar el número de unidades formadoras de colonia por mililitro (No. UFC/ml) al número de unidades formadoras de colonia por gramo de vermiculita (No. UFC/g V) [26].

D. *Evaluación de la estimulación de crecimiento*

La capacidad de *P. putida* KT2440 para promover el crecimiento de plantas de maíz fue evaluada a los 45 dpi en 30 plantas para cada tratamiento. En este trabajo se midió el peso seco de las plantas, para ello, éstas fueron extraídas de las macetas y las raíces fueron lavadas con cuidado para eliminar la vermiculita. Después, las raíces fueron separadas de la región aérea y se colocaron en bolsas de papel de forma independiente con etiquetas del tratamiento correspondiente. Las muestras fueron colocadas en una estufa para su secado a 70 °C durante 20 días. Después de este tiempo las muestras fueron sacadas de la estufa y colocadas a temperatura ambiente para pesarlas en una balanza analítica. Las mediciones fueron realizadas en 30 plantas para cada tratamiento. Los datos del peso seco fueron analizados de forma pareada usando la prueba *t*-student a una $P \leq 0.05$ mediante el programa Sigma Plot de Handel scientific Software. Cuando hubo diferencias estadísticas los tratamientos fueron marcados con letras diferentes.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se usó maíz azul autóctono de Papalotla, Tlaxcala, México (Figura 1): debido a que no hay trabajos que reporten resultados de inoculación bacteriana en esta variedad, por su relevancia para la preparación de comida tradicional mexicana [27] y también por su alto contenido de antocianinas que podría impactar en beneficios a la salud [28, 29].



Figura 1. Maíz azul autóctono originario de Papalotla, Tlaxcala, México

La adhesión y la colonización son primordiales para que una bacteria realice una correcta interacción con las plantas [18, 20, 21, 30] y en consecuencia esto es un factor decisivo para permitir que una bacteria otorgue efectos positivos para la estimulación del crecimiento de plantas [9].

La suspensión bacteriana con la que se inocularon las semillas de este trabajo estuvo en el rango de 10^6 UFC/ml (Tabla 1) y cuya densidad celular fue suficiente para obtener una efectiva adhesión. Se observó que *P. putida* KT2440 se adhirió en números altos a las semillas de maíz azul, alrededor de 10^7 UFC/semilla (Tabla 1). Esos números son similares a los previamente reportados para maíz híbrido (var. Golden Jubilee) [21].

Tabla 1. Promedio del número de bacterias presentes en distintas etapas de la investigación y desviación estándar.

Temperatura máxima de desarrollo de plantas	Tratamiento de inoculación de plantas	Número de células de <i>P. putida</i> KT2440 en la suspensión para inocular. (Log No. UFC/ml)	Adherencia de <i>P. putida</i> KT2440 en semillas (Log No. UFC/semilla)	Colonización rizosférica de <i>P. putida</i> KT2440 (Log No. UFC/g V)		
				15 dpi	30 dpi	40 dpi
30 °C	Sin inocular	0 (agua)	0	0	0	0
	Inoculadas	6.10 ± 0.38	7.40 ± 0.13	6.50 ± 0.20	5.70 ± 0.39	6.70 ± 0.62
40 °C	Sin inocular	0 (agua)	0	0	0	0
	Inoculadas	6.82 ± 0.29	7.75 ± 0.14	6.10 ± 0.16	4.80 ± 0.21	0

Se usó vermiculita estéril para realizar los experimentos de colonización y promoción de crecimiento de maíz, debido a que es un sustrato inerte con composición estándar sin fuentes de carbono o nitrógeno, ni minerales disponibles, razón por la que se pueden controlar los nutrientes que se adicionan para el crecimiento de las plantas y en este trabajo se adicionó MSJ [23, 26]. El uso de vermiculita estéril como sustrato también permite que las bacterias puedan colonizar a las plantas sin competencia de otra clase de microorganismos o efectos de la composición de un suelo no conocido.

La rizósfera se define como el suelo influenciado por los exudados de las raíces de las plantas [22] y en publicaciones previas se ha considerado que la vermiculita es un suelo controlado, razón por la que

se valida que una suspensión bacteriana obtenida a partir de la vermiculita íntimamente asociada a las raíces de las plantas contiene bacterias rizosféricas [9, 23, 26] y en el trabajo presente también se hizo esa consideración. La colonización de *P. putida* KT2440 en la rizósfera fue muy similar en los dos experimentos explorados a los 15 dpi (Tabla 1), en valores alrededor a 10^6 UFC/g de V. A los 30 dpi, el número de bacterias que colonizaron la rizósfera de plantas que crecieron a temperatura máxima de 40 °C fue ligeramente menor que el número de bacterias observado a 30 °C. A 45 dpi, las bacterias solo se detectaron en el tratamiento a 30 °C y no a 45 °C. Desconocemos porqué disminuye la población de bacterias cuando las plantas crecen a 40 °C, no obstante otras bacterias también decrecen cuando interactúan con plantas a lo largo de su desarrollo, probablemente debido a los cambios fisiológicos que sufre la planta que impiden el establecimiento de las poblaciones bacterianas o bien porque se ha despertado una respuesta de defensa de las plantas que podría afectar a la misma población benéfica [9, 21, 26]. La colonización rizosférica de *P. putida* KT2440 en este trabajo fue similar a la observada en maíz de la variedad Golden Jubilee que fue reportada en valores de 10^5 UFC/g de peso fresco de raíz [21]. La colonización de rizósfera ha sido reportada para otras bacterias, por ejemplo, la colonización de *Burkholderia* sp., *B. megaterium* y *Sphingomonas* sp. ha sido observada en números alrededor de 10^4 UFC/g de peso fresco de raíz, después de cinco semanas de crecimiento de plantas de maíz [31, 32]. *P. fluorescens* fue capaz de colonizar las raíces de maíz en una población alrededor de 10^5 UFC/g de rizósfera a los 35 días de desarrollo [33]. A pesar de que la adhesión y la colonización de *P. putida* KT2440 a los 15 dpi fueron muy similares en los dos experimentos explorados (30 °C y 40 °C) los resultados de estimulación de crecimiento fueron diferentes. En el futuro será interesante conocer si la caída de población observada a los 45 dpi en plantas crecidas a temperatura máxima de 40 °C está relacionada con la mejor promoción de crecimiento de las plantas.

En acuerdo con publicaciones previas, los parámetros comúnmente usados para evaluar la promoción de crecimiento son la altura de las plantas, el diámetro de los tallos de las plantas, el peso fresco y seco de las plantas [9, 23, 26]. De estas mediciones, el incremento del peso seco de las plantas inoculadas con respecto a las no inoculadas es una de las más relevantes para demostrar que una bacteria promueve su crecimiento [32, 33]. En la presente investigación, se observó que las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 mostraron valores de peso seco incrementados con referencia a plantas no inoculadas, tanto de raíz como de región aérea (Figura 2 y 3). Bajo condiciones de temperatura máxima de desarrollo de las plantas (30 °C), se observó que las raíces de las plantas inoculadas con la bacteria fue ligeramente mayor (1.54 g) con referencia al de las plantas no inoculadas (1.39 g), pero estadísticamente diferentes (Figura 2). En estas condiciones los valores del peso seco de la región aérea de plantas inoculadas (3.66 g) fueron incrementados con referencia a las plantas no inoculadas (3.10 g) (Figura 3). Bajo la otra condición de temperatura máxima de desarrollo de las plantas (40 °C) se observó que las raíces de las plantas inoculadas con la bacteria fueron mucho mayores (3.75 g) con referencia al de las plantas no inoculadas (1.42 g) y son estadísticamente diferentes (Figura 2). Los valores del peso seco de la región aérea de plantas inoculadas (5.04 g) fueron altamente incrementados con referencia a las plantas no inoculadas (3.19 g) (Figura 3), bajo estas condiciones (40 °C).

El peso seco tanto de la región aérea como de las raíces de plantas no inoculadas fue estadísticamente igual para ambas condiciones experimentales (30 °C y 40 °C). Sin embargo, los resultados muestran que el peso seco de las plantas inoculadas fue mayor para la condición de crecimiento a temperatura máxima de 40 °C que los incrementos observados en temperatura máxima de 30 °C (Figura 2 y 3). Aunque los valores de promoción del crecimiento de plantas a 30 °C fueron menores a los observados a 40 °C, la apariencia de las plantas fue claramente mayor en plantas inoculadas en relación con no inoculadas (no mostrado).

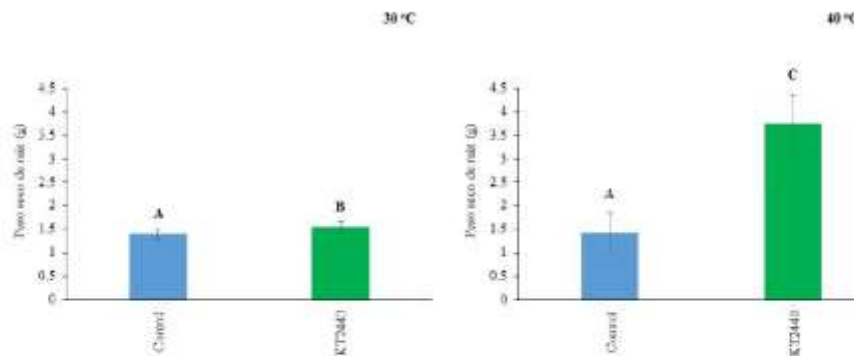


Figura 2. Peso seco de las raíces de maíz azul tanto de plantas inoculadas como no inoculadas.

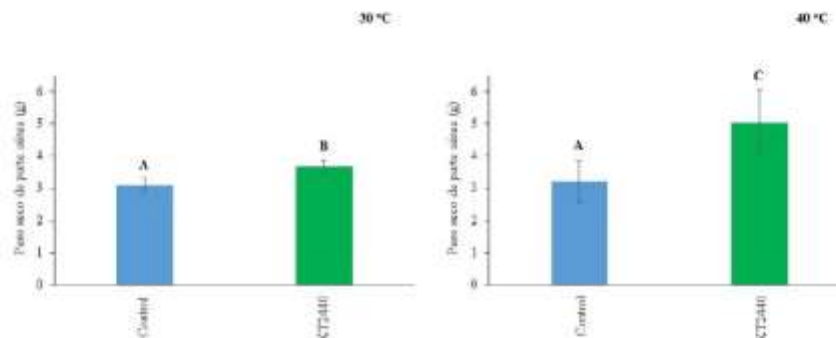


Figura 3. Peso seco de la parte aérea del maíz azul tanto de plantas inoculadas como no inoculadas.

Existen varios mecanismos de promoción de crecimiento de plantas reportados para bacterias [3, 34]. Estos han sido clasificados en directos e indirectos [22]. En los mecanismos directos las bacterias benéficas proporcionan nutrientes esenciales para el desarrollo de las plantas entre los que destaca la fijación biológica de nitrógeno y la solubilización de fosfatos. En los mecanismos indirectos las bacterias benéficas afectan el crecimiento de fitopatógenos, ya sea por la producción de sustancias inhibitorias o bien por el desencadenamiento de una respuesta de defensa protectora en las plantas contra patógenos. Los mecanismos potenciales de *P. putida* KT2440 para estimular el crecimiento de plantas podrían ser la producción de sideróforos que está relacionada con su capacidad de adherencia a las semillas [35], la producción de sustancias inhibitorias que podría incrementar su competitividad [36, 37], el desencadenamiento de una respuesta de defensa efectiva contra patógenos de tipo ISR [20, 21]. En la cepa de *P. putida* BIRD-1 que está muy relacionada a *P. putida* KT2440 se ha demostrado la existencia de genes para la producción del ácido indol acético y solubilización de fosfatos [38] y la capacidad para solubilizar fosfatos también ha sido demostrada en la cepa *P. putida* Bo [39]; lo que podría sugerir que la cepa KT2440 también tiene esas capacidades. En el presente trabajo no sabemos cuál de estos mecanismos podría estar implicado en la promoción del crecimiento observada en las plantas de maíz azul. No obstante, es probable que la situación de estrés generado por el incremento de temperatura, permita una mejor expresión de los genes implicados en la estimulación de crecimiento. Se ha observado que dependiendo de la condición en la que se desarrolla *P. putida* KT2440 ocurre una expresión diferencial de sus genes [40] e incluso la expresión de genes varía en dependencia de la fase

de crecimiento de la bacteria [41]. Será importante en el futuro evaluar como ocurre la expresión de genes de interés, para potenciar la función benéfica de las bacterias que se asocian a plantas [1].

IV. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La promoción de crecimiento de *P. putida* KT2440 en maíz azul fue observada en las dos condiciones de temperatura máxima exploradas (30 y 40 °C). Sin embargo, la estimulación fue mayor a 40 °C con respecto a la condición de 30 °C. Es interesante notar que las bacterias de esta especie se adherieron de forma adecuada al maíz azul y que colonizaron de forma similar en las dos condiciones de temperatura exploradas a los 15 dpi, pero el número de bacterias disminuyó en la condición de 40 °C, sugerimos que la respuesta de estimulación de crecimiento está relacionada con el estrés de la planta y que la bacteria contribuye a aliviarlo. Además, sugerimos que la bacteria expresa mejor sus genes de promoción de crecimiento en condiciones extremas de temperatura cuando interaccionan con las plantas. Trabajo futuro será necesario para averiguar cuáles son los mecanismos por los cuales *Pseudomonas putida* KT2440 es capaz de promover el crecimiento de maíz y porque esa capacidad se incrementa cuando la planta se crece a temperaturas elevadas.

RECONOCIMIENTOS

Agradecemos a Redes PRODEP 2015-2016 (CA-262), DITCo2016-3, VIEP-BUAP-2016 (00476 y 00513) por el apoyo para fines de investigación. D. Molina-Romero y A.-L. Hernández-Tenorio son becarias de CONACYT, por lo que agradecemos a esta institución. También agradecemos al Dr. Antonino Baez del CICM-ICUAP por sus valiosos comentarios sobre este trabajo.

REFERENCIAS

- [1] A. Baez-Rogelio, Y. E. Morales-García, V. Quintero-Hernández, and J. Muñoz-Rojas, "Next generation of microbial inoculants for agriculture and bioremediation", *Microb. Biotechnol.*, Epub. Ahead of Print, doi: 10.1111/1751-7915.12448, October 2016.
- [2] L. A. Pazos-Rojas, V. Marín-Cevada, Y. E. Morales-García, Antonino Baez, M. A. Villalobos-López, M. Pérez-Santos, et al., "Uso de microorganismos benéficos para reducir los daños causados por la revolución verde", *Rev. Iberoamer. Cienc.*, vol. XX, pp. xx-xx, December 2016. Aceptado para publicación.
- [3] B. Lugtenberg, and F. Kamilova, "Plant-Growth-promoting rhizobacteria", *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 63, pp. 541-556, October 2009.
- [4] R. Vivanco-Calixto, D. Molina-Romero, Y. E. Morales-García, V. Quintero-Hernández, A. Munive-Hernández, A. Baez-Rogelio, et al., "Reto agrobiotecnológico: inoculantes de segunda generación" *Alianzas y Tendencias OCT-DITCo*, vol. 1(1), pp. 9-19, April 2016.
- [5] S. Dobbelaere, A. Croonenborghs, A. Thys, D. Ptacek, J. Vanderleyden, P. Dutto, et al., "Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*", *Aust. J. Plant Physiol.*, vol. 28(9), pp. 871-879, September 2001.
- [6] J. E. Thies, P. W. Singlethorn, and B. B. Bohlol, "Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes", *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 57(1), pp. 19-28, January 1991.
- [7] Y. Bashan, L. E. de-Bashan, S. R. Prabhu, and J. P. Hernandez, "Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013)", *Plant Soil*, vol. 378(1-2), pp. 1-33, May 2014.
- [8] J. Caballero-Mellado, and L. E. Fuentes-Ramírez, "Bacterial biofertilizers", in *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, vol. 1, Z.A. Siddiqui (ed.), Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2004, pp. 143-172.
- [9] J. Muñoz-Rojas, and J. Caballero-Mellado, "Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth", *Microb. Ecol.*, vol. 46(4), pp. 454-464, December 2003.

- [10] P. Domínguez-Cuevas, J.-E. González-Pastor, S. Marquez, J.-L. Ramos, and V. de Lorenzo, "Transcriptional tradeoff between metabolic and stress-response programs in *Pseudomonas putida* KT2440 cells exposed to toluene", *J. Biol. Chem.*, vol. 281(17), pp. 11981–11991, April 2006.
- [11] D. Benndorf, M. Thiersch, N. Löffhagen, C. Kunath, and H. Harms, "*Pseudomonas putida* KT2440 responds specifically to chlorophenoxy herbicides and their initial metabolites", *Proteomics*, vol. 6(11), pp. 3319–3329, June 2006.
- [12] C. Roma-Rodrigues, P. M. Santos, D. Benndorf, E. Rapp, and I. Sá-Correia, "Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to phenol at the level of membrane proteome", *J. Proteomics*, vol. 73(8), pp. 1461–1478, June 2010.
- [13] D. Regenhardt, H. Heuer, S. Heim, D. U. Fernández, C. Strömpl, E. R. B. Moore, *et al.*, "Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440", *Env. Microbiol.*, vol. 4(12), pp. 912–915, December 2002.
- [14] J. I. Jiménez, B. Miñambres, J. L. García, and E. Díaz, "Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440", *Env. Microbiol.*, vol. 4(12), pp. 824–841, December 2002.
- [15] K. E. Nelson, C. Weinel, I. T. Paulsen, R. J. Dodson, H. Hilbert, V. A. P. Martins dos Santos, *et al.*, "Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440", *Environ. Microbiol.*, vol. 4(12), pp. 799–808, December 2002.
- [16] M. M. Bagdasarian, and K. N. Timmis, "Host vector systems for gene cloning in *Pseudomonas*", *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 43(4), pp. 287–293, June 1982.
- [17] J. M. Alatorre-Cruz, M. R. Bustillos-Cristales, H. Gutierrez-Sánchez, Y. E. Morales-García, D. Molina-Romero, A. R. Netzahuatl-Muñoz, y J. Muñoz-Rojas, "Estimulación del crecimiento de *Echinocactus platyacanthus* con bacterias PGPR", *Saberes Compartidos, Rev. Invest. Cient. Tecnol. Hum.*, 11(7), pp. 33–40.
- [18] L. Molina, C. Ramos, E. Duque, M. C. Ronchel, J. M. García, L. Wyke, *et al.*, "Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions", *Soil Biol. Biochem.*, vol. 32(3), pp. 315–321, March 2000.
- [19] M. Fernández, J. L. Niqui-Arroyo, S. Conde, J. L. Ramos, and E. Duque, "Enhanced tolerance of naphthalene and enhanced rhizoremediation performance for *Pseudomonas putida* KT2440 via the NAH7 catabolic plasmid", *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 78(15), pp. 5104–5110, August 2012.
- [20] M. A. Matilla, J. L. Ramos, P. H. A. M. Baker, R. Doombos, D. V. Badri, J. M. Vivanco, *et al.*, "*Pseudomonas putida* KT2440 causes induced systemic resistance and changes in Arabidopsis root exudation", *Environ. Microbiol. Reports*, vol. 2(3), pp. 381–388, June 2010.
- [21] C. Planchamp, G. Glauser, and B. Mauch-Mani, "Root inoculation with *Pseudomonas putida* KT2440 induces transcriptional and metabolic changes and systemic resistance in maize plants", *Front. Plant Sci.*, vol. 5(179), pp. 1–10, January 2015.
- [22] D. Molina-Romero, M. R. Bustillos-Cristales, O. Rodríguez-Andrade, Y. E. Morales-García, Y. Santiago-Saenz, M. Castañeda-Lucio *et al.*, "Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico", *Biológicas*, vol. 17(2), pp. 24–34, December 2015.
- [23] Y. E. Morales-García, D. Juárez-Hernández, C. Aragón-Hernández, M. A. Mascarúa-Esparza, M. R. Bustillos-Cristales, L. E. Fuentes-Ramírez, *et al.*, "Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter* sp. as a model for alternative agriculture", *Rev. Argent. Microbiol.*, vol. 43(4), p.p. 287–293, December 2011.
- [24] J. Muñoz-Rojas, P. Bernal, E. Duque, P. Godoy, A. Segura, and J. L. Ramos, "Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying", *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 72(1), pp. 472–477, January 2006.
- [25] A. Corral-Lugo, Y. E. Morales-García, L. A. Pazos-Rojas, A. Ramírez-Valverde, R. D. Martínez-Contreras, and J. Muñoz-Rojas. Quantification of cultivable bacteria by the "Massive Stamping Drop Plate" method. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, vol. 14(2), pp. 173-182, December 2012.

- [26] O. Rodríguez-Andrade, L. E. Fuentes-Ramírez, Y. E. Morales-García, D. Molina-Romero, M. R. Bustillos-Cristales, R. D. Martínez-Contreras, *et al.*, "The decrease in the population of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane after nitrogen fertilization is related to plant physiology in split root experiments", *Rev. Argent. Microbiol.*, vol. 47(4), pp. 335–343, December 2015.
- [27] R. Fernández-Suárez, L. A. Morales-Chávez, and A. Gálvez-Mariscal, "Importance of Mexican maize landraces in the national diet. An essential review", *Rev. Fitotec. Mex.*, vol. 36(3), pp. 275–283, October 2013.
- [28] L. Lopez-Martínez, R. M. Oliart-Ros, G. Valerio-Alfaro, C.-H. Lee, K. L. Parkin, and H. S. Garcia, "Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize", *LWT Food Sci. Technol.*, vol. 42(6), pp. 1187–1192, July 2009.
- [29] Y. Salinas-Moreno, C. García-Salinas, B. Coutiño-Estrada, and V. A. Vidal-Martínez, "Variabilidad en contenido y tipo de antocianinas en granos de color azul/morado de poblaciones mexicanas de maíz", *Rev. Fototec. Mex.*, 36(3-A), pp. 285–294, October 2013.
- [30] A. Von Felten, G. Défago, and M. Maurhofer, "Quantification of *Pseudomonas fluorescens* strains F113, CHA0 and Pfl53 in the rhizosphere of maize by strain-specific real-time PCR unaffected by the variability of DNA extraction efficiency", *J. Microbiol. Methods*, vol. 81(2), pp. 108–115, May 2010.
- [31] S. Saia, V. Rappa, P. Ruisi, M. Abenavoli, F. Sunseri, D. Giambalvo, *et al.*, "Soil inoculation with symbiotic microorganisms promotes plant growth and nutrient transporter genes expression in durum wheat", *Front. Plant Sci.*, vol. 6, pp. 1–10, October 2015.
- [32] X. Sheng, L. Sun, Z. Huang, L. He, W. Zhang, and Z. Chen, "Promotion of growth and Cu accumulation of bio-energy crop (*Zea mays*) by bacteria: implications for energy plant biomass production and phytoremediation", *J. Environ. Manage.*, vol. 103, pp. 58–64, July 2012.
- [33] I. Ahmad, M. J. Akhtar, H. N. Asghar, U. Ghafoor, and M. Shahid, "Differential effects of plant growth-promoting rhizobacteria on maize growth and cadmium uptake", *J. Plant Growth Regul.*, vol. 35(2), pp. 303–315, June 2016.
- [34] B. R. Glick, "Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications", *Scientifica*, vol. 2012(ID963401), pp. 1–15, September 2012.
- [35] M. A. Molina, J. L. Ramos, and M. Espinosa-Urgel, "A two-partner secretion system is involved in seed and root colonization and iron uptake by *Pseudomonas putida* KT2440", *Environ. Microbiol.*, vol. 8(4), pp. 639–647, April 2006.
- [36] A. H. A. Parret, and R. De Mot, "Bacteria killing their own kind: novel bacteriocins of *Pseudomonas* and other γ -proteobacteria", *Trends Microbiol.*, vol. 10(3), pp. 107–112, March 2002.
- [37] P. Bernal, L. P. Allsopp, A. Filloux, and M. A. Llamas, "The *Pseudomonas putida* T6SS is a plant warden against phytopatogens", *ISME J.*, vol. 3, pp. 1–16, January 2017.
- [38] M. A. Matilla, P. Pizarro-Tobías, A. Roca, M. Fernández, E. Duque, L. Molina, *et al.*, "Complete genome of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* BIRD-1", *J. Bacteriol.*, vol. 193(5), pp. 1290, March 2011.
- [39] A. Pandey, P. Trivedi, B. Kumar, and L. M. S. Palni, "Characterization of phosphate solubilizing and antagonistic strain of *Pseudomonas putida* (Bo) isolated from a sub-alpine location in the Indian Central Himalaya", *Curr. Microbiol.*, vol. 53(2), pp. 102–107, August 2006.
- [40] M. I. Ramos-González, M. J. Campos, and J. L. Ramos, "Analysis of *Pseudomonas putida* KT2440 gene expression in the maize rhizosphere: in vitro expression technology capture and identification of root-activated promoters", *J. Bacteriol.*, vol. 187(12), pp. 4033–4041, June 2005.
- [41] L. Yuste, A. B. Hervás, I. Canosa, R. Tobes, J. I. Jiménez, J. Nogales, *et al.*, "Growth phase-dependent expression of the *Pseudomonas putida* KT2440 transcriptional machinery analysed with a genome-wide DNA microarray", *Env. Microbiol.*, vol. 8(1), pp. 165–177, January 2006.

RESULTADOS DEL EXPERIMENTO 2: Maíz inoculado individual y con el consorcio (4 cepas) bajo condiciones de hidratación óptima antes de la germinación y crecimiento de las plantas entre 25-30 °C.

Por los resultados obtenidos en el experimento 1, se decidió probar una mezcla bacteriana formulada con 4 bacterias: *A. brasilense* Sp7, *P. putida* KT2440 y *Sphingomonas* sp. OF178 y *Acinetobacter* sp. EMM02, eliminando la cepa *Enterobacter* sp UAPSO3001 por los efectos adversos que esta bacteria mostró con las plantas cuando el maíz experimenta estrés por altas temperaturas.

El número de bacterias fue cuantificado para la mezcla bacteriana y las suspensiones individuales (Tabla S3) (Molina-Romero, Baez, *et al.* 2017), que se emplearon para la inoculación de las semillas de los experimentos 2 y 3, sin estrés y con estrés por desecación antes de la germinación. Las poblaciones bacterianas de las suspensiones fueron similares para los dos experimentos.

Las cuatro cepas mostraron adecuada adhesión a las semillas, en mono-inoculación y en co-inoculación. El número de bacterias adheridas a la semilla osciló entre 10^5 a 10^7 UFC/semilla (Tabla S4) (Molina-Romero, Baez, *et al.* 2017).

La colonización de *A. brasilense* Sp7, *P. putida* KT2440 y *Sphingomonas* sp. OF178 y *Acinetobacter* sp. EMM02 a la rizósfera de las plantas fue eficiente en la inoculación individual y en co-inoculación. La evaluación de la colonización se realizó durante tres estadios de desarrollo de las plantas de maíz, se presentan los resultados generados a los 45 días posteriores a la siembra (DAS por sus siglas en inglés, 45 Days After Sowing).

La colonización bacteriana de las plantas inoculadas con la mezcla bacteriana es similar a la observada en las plantas mono-inoculas (Tabla S5); (Molina-Romero, Baez, *et al.* 2017). La población bacteriana asociada a la rizósfera fue obtenida en un rango de 10^5 a 10^8 UFC/g de vermiculita (V).

El efecto de la mono-inoculación y la co-inoculación sobre el crecimiento de las plantas de maíz fue evaluada a los 45 DAS bajo condiciones de invernadero. Se observó que plantas inoculadas con cepas independientes (*A. brasilense* Sp7, *P. putida* KT2440 y *Sphingomonas* sp. OF178 y *Acinetobacter* sp. EMM02) significativamente incrementó la altura de la planta, peso seco de parte aérea y raíz en comparación a plantas no inoculadas (Fig. 2C, A y B) (Molina-Romero, Baez, *et al.* 2017). No hay diferencia significativa en el diámetro de las plantas mono-inoculadas y las plantas control (plantas no inoculadas), excepto para *P. putida* KT2440 que presentó mayor diámetro en comparación a las plantas control (Fig 2D). En general las plantas inoculadas con la mezcla bacteriana siempre mostraron mayores valores en los parámetros de crecimiento y mejor apariencia comparadas con las plantas mono-inoculas y las control (Fig 2) (Molina-Romero, Baez, *et al.* 2017). El peso seco de la parte aérea de las plantas multi-inoculadas presentó un 75%

mayor a las plantas control. La misma tendencia se observó en el peso seco de la raíz, altura de la planta y diámetro registrando de las plantas inoculadas con la mezcla bacteriana en comparación a las plantas control.

RESULTADOS DEL EXPERIMENTO 3: Efecto en la promoción del crecimiento maíz inoculado individual y con el consorcio bajo condiciones de desecación antes de la germinación y crecimiento de las plantas entre 25-30 °C.

Las semillas de maíz azul fueron inoculadas con la suspensión de cada cepa y con la suspensión de la mezcla bacteriana en la cual previamente fue cuantificada la población bacteriana (Tabla 5) (Molina-Romero, Baez, *et al.* 2017). Posteriormente las semillas se colocaron en una cámara de desecación por un periodo de 18 días, terminando este periodo se sembraron estas semillas inoculadas y desecadas. La BSR de las cepas asociadas a las semillas fue calculada para corroborar la resistencia a la desecación (Fig 3) (Molina-Romero, Baez, *et al.* 2017). En las semillas mono-inoculadas con las cepas *A. brasilense* Sp7, y *Sphingomonas* sp. OF178 y *Acinetobacter* sp. EMM02, estas mostraron alta tolerancia a la desecación tanto en los experimentos en agua (control); así como en los dos tipos de suelo particularmente *Acinetobacter* sp. EMM02. Por otra parte, *P. putida* KT2440 no fue detectada a los 12 días posteriores del inicio de la desecación (por sus siglas en inglés 12 DABD: Days After the Beginning of Desiccation).

La supervivencia de las tres cepas altamente tolerantes a la desecación asociadas a las semillas presentaron una tendencia similar en mono y co-inoculación de las semillas (Fig 3) (Molina-Romero, Baez, *et al.* 2017). En contraste, *P. putida* KT2440 en co-inoculación presentó mayor resistencia a la desecación (BSR de 78 a 9 DABD) en comparación a la mono-inoculada (BSR de 0 a 9 DABD). Aparentemente, la inoculación de la mezcla permite a *P. putida* KT2440 incrementar su tolerancia a la desecación.

La adhesión de las bacterias desecadas a las semillas fue evaluado a las 12 horas después del sembrado, se observó que las cepas tolerantes a la desecación (*A. brasilense* Sp7, *Acinetobacter* sp. EMM02, *Sphingomonas* sp. OF178) presentaron altas poblaciones bacterianas, tanto en mono y en co-inoculación (Tabla S5) y en ambas condiciones exploradas (sin estrés y con estrés por desecación). Por el contrario *P. putida* KT2440 no fue detectada en la evaluación a la adhesión.

La colonización de la rizósfera de las cuatro cepas (posterior a la desecación Exp. 3) fue similar a las observadas en los experimento sin estrés (Exp. 1 y 2), presentando altas poblaciones bacterianas en forma individual y en co-inoculación. El número de bacterias detectadas en la rizósfera durante el desarrollo de las plantas osciló entre 10^5 a 10^8 UFC/gV (Tabla S5) (Molina-Romero, Baez, *et al.* 2017). La colonización bacteriana de las plantas inoculadas con la mezcla bacteriana fue similar a la observada en las plantas mono-inoculadas (Tabla S5).

En el Exp. 3 *P. putida* KT2440 no fue detectada durante el proceso de desecación a los 12 DABD y en la evaluación de la adhesión seguida a la hidratación. Interesantemente, esta bacteria fue detectada en la colonización de la rizósfera de las plantas en números 10^6 UFC/gV en los tres estadios de crecimiento de las plantas donde fue evaluada la colonización. Probablemente durante el proceso de desecación *P. putida* KT2440 entro a un estado viable no cultivable.

La población bacteriana rizosférica de las cuatro cepas evaluadas fue mantenida a través del tiempo tanto en condiciones sin estrés y en condiciones de desecación (Exp 1, 2 y 3) indicando que estas cepas pueden coexistir sin generar relaciones antagónicas en asociación a la planta.

La identidad de algunas cepas aisladas de la rizósfera a partir de las plantas inoculadas en los experimentos 2 y 3 fue corroborada de forma molecular mediante ribotipado. Se amplificó el gen que codifica el 16S rRNA, y posteriormente se generó el patrón de restricción con las enzimas *MspI*, *AluI*, *HhaI*, *HinfI*, *RsaI* y *MboI* del amplificado de 1.5 Kb.

Los patrones de restricción generados con las enzimas *AluI*, *HhaI*, *RsaI*, *MboI* y *MspI* permitieron diferenciar el genotipo de las cuatro cepas tipo que conforman a la mezcla bacteriana.

Para corroborar la identidad genotípica de los aislados rizosféricos de plantas de 45 DAS (por sus siglas en inglés: DAS days after sowing) se les realizaron ribotipado con la enzima *MspI* Fig. S5, a partir de colonias crecidas en medios de selección para cada cepa bacteriana; confirmando que los medios de selección y el ribotipado son herramientas eficientes para la identificación de las cepas que conforman la mezcla bacteriana diseñada en este trabajo.

Las plantas de 45 DAS mono-inoculadas con *A. brasilense* Sp7 y *P. putida* KT2440 en el Exp.3 mostraron mayor peso seco de la parte aérea que las plantas control, con excepción de *Acinetobacter* sp. EMM02 (Fig. 2 A) (Molina-Romero, Baez, *et al.* 2017). Estos resultados contrastan con los resultados del Exp.2 (sin estrés) en el que todas plantas mono-inoculadas con las cuatro cepas presentaron mayores parámetros de crecimientos en comparación a las plantas control.

Las plantas inoculadas con la mezcla bacteriana del Exp.3 (semillas inoculadas y sometidas a desecación) mostraron mayor altura, peso seco de parte aérea y raíz en comparación a las plantas mono-inoculadas y las plantas control (Fig 2 A-C y F). El diámetro de las plantas co-inoculadas fue 8% mayor que las plantas control. Las plantas inoculadas con la mezcla bacteriana; en general, presentaron mayores parámetros de crecimiento en comparación a las plantas mono-inoculadas, excepto el parámetro del diámetro (Fig 2 D).

Los resultados generados de este trabajo de tesis se publicaron en el artículo que a continuación se muestra:



RESEARCH ARTICLE

Compatible bacterial mixture, tolerant to desiccation, improves maize plant growth

Dalia Molina-Romero^{1,2}, Antonino Baez¹, Verónica Quintero-Hernández³, Miguel Castañeda-Lucio⁴, Luis Ernesto Fuentes-Ramírez¹, María del Rocío Bustillos-Cristales¹, Osvaldo Rodríguez-Andrade¹, Yolanda Elizabeth Morales-García^{1,2}, Antonio Munive¹, Jesús Muñoz-Rojas^{1*}

1 Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana (LEMM), Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM), Instituto de Ciencias (IC), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), Edificio IC11, Ciudad Universitaria, Colonia Jardines de San Manuel, Puebla, Puebla, México, **2** Laboratorio de Biología Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, BUAP, Edificio 112-A, Ciudad Universitaria, Colonia Jardines de San Manuel, Puebla, Puebla, México, **3** CONACYT, LEMM, CICM, IC-BUAP, Edificio IC11, Ciudad Universitaria, Colonia Jardines de San Manuel, Puebla, Puebla, México, **4** Genética Molecular Microbiana, CICM, IC-BUAP, Edificio IC11, Ciudad Universitaria, Colonia Jardines de San Manuel, Puebla, Puebla, México

* joymorre@yahoo.com.mx



OPEN ACCESS

Citation: Molina-Romero D, Baez A, Quintero-Hernández V, Castañeda-Lucio M, Fuentes-Ramírez LE, Bustillos-Cristales Mdr, et al. (2017) Compatible bacterial mixture, tolerant to desiccation, improves maize plant growth. *PLoS ONE* 12(11): e0187913. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187913>

Editor: Seon-Woo Lee, Dong-A University, REPUBLIC OF KOREA

Received: June 22, 2017

Accepted: October 27, 2017

Published: November 8, 2017

Copyright: © 2017 Molina-Romero et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Some relevant data are within the paper and its Supporting Information files. The GenBank accession number for the sequence of the gene encoding for 16S rRNA of *Acinetobacter* sp. EMM02 is KU686485.

Funding: The work was supported by the following: Apoyo Redes PRODEP 2015-2016 (CA-262 and CA-244); Ciencia Básica CONACYT CB2019-156576-2; DITCo2016-3, DITCo2016-4; and VIEP-BUAP-2016 (00450, 00513, 00476,

Abstract

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) increase plant growth and crop productivity. The inoculation of plants with a bacterial mixture (consortium) apparently provides greater benefits to plant growth than inoculation with a single bacterial strain. In the present work, a bacterial consortium was formulated containing four compatible and desiccation-tolerant strains with potential as PGPR. The formulation had one moderately (*Pseudomonas putida* KT2440) and three highly desiccation-tolerant (*Sphingomonas* sp. OF178, *Azospirillum brasilense* Sp7 and *Acinetobacter* sp. EMM02) strains. The four bacterial strains were able to adhere to seeds and colonize the rhizosphere of plants when applied in both mono-inoculation and multi-inoculation treatments, showing that they can also coexist without antagonistic effects in association with plants. The effects of the bacterial consortium on the growth of blue maize were evaluated. Seeds inoculated with either individual bacterial strains or the bacterial consortium were subjected to two experimental conditions before sowing: normal hydration or desiccation. In general, inoculation with the bacterial consortium increased the shoot and root dry weight, plant height and plant diameter compared to the non-inoculated control or mono-inoculation treatments. The bacterial consortium formulated in this work had greater benefits for blue maize plants even when the inoculated seeds underwent desiccation stress before germination, making this formulation attractive for future field applications.

Introduction

The inoculation of plants with beneficial microorganisms is a practice used in modern agriculture and offers advantages to crops, such as increasing plant growth and triggering protection

00510). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

to different diseases [1,2]. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are bacteria influenced by plant root exudates that have the ability to improve plant growth over the short term [3] and crop production over the long term [4,5]. Some examples of PGPR include strains of *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Enterobacter cloacae*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium leguminosarum*, and *Sinorhizobium meliloti* [6,7].

There are several ways by which PGPR could directly facilitate plant growth, such as biological N₂ fixation, phosphate solubilization and phytohormone production [3,8]. In addition, PGPR could indirectly promote plant growth by preventing the negative effects of phytopathogenic organisms through the production of antimicrobial compounds or the elicitation of induced systemic resistance (ISR) [7,9]. Sustainability issues in agriculture can no longer be overlooked and are a priority for several countries around the world [2,10]; in this regard, the application of microbial inoculants to the fields might help to ensure sustainable crop production at low cost.

The inoculation of seeds with multiple beneficial bacteria might have greater potential for plant growth promotion and biological control than inoculation with a single bacterial species [1,11]. Bacterial consortiums as inoculants could have superior effects on plants since different types of microorganisms might interact synergistically to provide nutrients, remove inhibitory products and stimulate one another through physical or biochemical activities that may enhance some beneficial aspects of their physiology [12,13]. Some examples include the co-inoculation of chickpea with *Serratia marcescens* (SF3), *Serratia* spp. (ST9), and *Mesorhizobium ciceri*, which increased the number of nodules per plant, nodule dry weight, number of pods per plant, grain yield, protein content, and total chlorophyll content under irrigated and rainfed conditions compared to inoculation with single bacterial strains [14]. Sugarcane inoculation with a consortium of 5 diazotrophic bacteria (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense*, and *Paraburkholderia tropica*) also showed higher stem production in two soils with low-to-medium levels of chemical fertilizer compared to mono-inoculated plants [15].

The design, formulation and optimization of effective bacterial consortium inoculants is not an easy task; it requires a deep understanding of modes of interaction, bacterial adhesion to seeds and plant root colonization [1,11]. Furthermore, antagonistic relationship studies should be conducted before the design and application of formulations containing bacterial consortiums since some antagonistic effects may occur in bacterial consortiums associated with plants [15].

Another issue impacting the effectiveness of PGPR is drought stress, which is particularly important when rhizobia are used as plant inoculants since desiccation affects cell viability during storage in carrier-based inoculants and field soils [16–18]. Therefore, desiccation-tolerant bacteria are highly desirable because they can remain in soils and inoculant formulations for a longer time than those that are not tolerant to desiccation, and they can improve plant colonization under low water availability [16,18]. In natural environments, organisms termed anhydrobionts are able to survive desiccation by entering a dormant stage during which metabolism is undetected [19]. When rehydrated, these organisms quickly restore their metabolic processes and resume life [20]. In the present work, four compatible bacterial strains tolerant to desiccation with potential as PGPR were selected to formulate a liquid bacterial consortium. Seeds of autochthonous blue maize (Papalotla, Tlaxcala, México) were inoculated with the bacterial consortium and the individual bacterial strains, and their ability to adhere, colonize and promote growth was evaluated in plants grown from inoculated seeds subjected to two experimental conditions before sowing: normal hydration (without desiccation stress) or desiccation (with desiccation stress). Maize is the most important cereal in Mexico and is

preponderant in Latin America; furthermore, it serves as raw material for the production of processed food, such as snacks and cereal bars [21]. Autochthonous blue maize was selected in this work because of its importance in the preparation of traditional Mexican food [21] and the health benefits related to its high content of anthocyanin. Moreover, studies have documented that blue maize anthocyanin modifies the structure of starch, generating an antioxidant environment in the colon that prevents cellular proliferation and cancer [22,23].

Materials and methods

Bacterial strains

Twenty bacterial strains belonging to the genera *Azospirillum*, *Acinetobacter*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Paraburkholderia* and *Sphingomonas* were used in initial screening assays (S1 Table).

GenBank accession number

The sequence of the gene encoding the 16S rRNA from *Acinetobacter* sp. EMM02 (partially characterized in this work) was deposited in the GenBank database with the accession number KU686485.

Blue maize

Autochthonous blue maize was collected from a field located in San Diego Buena Vista, Papalotla de Xicohtencatl, Tlaxcala, México (Latitude: 19.172353, Longitude: -98.164799). This blue maize has been cultivated every year for a very long time in that location. Because the maize used in this work has not been previously described, we propose to denominate this maize blue maize CAP15-1 TLAX.

Soil

The soil used in the present work was collected from the same locations where the blue maize was sampled. Permission to collect the soil was granted by Mrs. Iris Sauz Muñoz (owner of the land) and endorsed by the president of the Papalotla Tlaxcala Ejidal Committee.

Antagonism assays

Twenty strains were tested both as producers of antagonistic substances and as indicator strains using the double agar layer method ([dx.doi.org/10.17504/protocols.io.j4mcqu6](https://doi.org/10.17504/protocols.io.j4mcqu6)) [24,25]. We used PY-Ca medium for these assays because this is a wide-spectrum growth medium, and all the strains used in this work were able to grow. PY-Ca contains 5 g peptone, 3 g yeast extract, and 0.7 g calcium chloride per liter of medium [26,27].

Bacterial desiccation assays

Different strains that are able to co-exist with other strains were used to carry out desiccation assays as described in an established protocol ([dx.doi.org/10.17504/protocols.io.j4icque](https://doi.org/10.17504/protocols.io.j4icque)) in SYP medium (10 g sucrose, 3 g yeast extract, 1 g K₂HPO₄, 3 g KHPO₄, 1 L water, pH 6). Strains were grown until the stationary phase for the desiccation experiments because the bacterial tolerance to desiccation increases during this stage in comparison to the exponential phase [28]. The bacterial suspensions contained approximately 1×10^9 CFU/mL before desiccation. The counting of cultivable cells was conducted after the rehydration of the desiccated cells every three days for a period of twelve days using the massive stamping drop plate (MSDP) method

[29], and the bacterial survival ratio (BSR) was calculated as the ratio of the log of the number of bacterial cells present in the suspension at any time after the beginning of desiccation (AbD) plus one to the log of the number of viable cells before desiccation (BD), multiplied by 100, i.e., $BSR = (\log AbD + 1 / \log BD) \times 100$ [24]. The BSR is a parameter that allowed us to quantify the desiccation tolerance of the bacteria.

Compatibility of the strains selected for the bacterial consortium

Bacteria were grown individually or together in SYP and PY-Ca liquid medium at 30°C and 200 rpm for 120 hours; each culture was generated in triplicate. The number of cultivable cells was quantified in quintuplicate using the MSDP method with selective medium plates to identify any inhibitory relationships among the co-inoculated strains as described in other works [24,30].

For these experiments bacteria were quantified in their own selection medium, developed in this work, that allow the growth of one of the four strains and limit the growth of the others. We began the screening with reported media such as Congo Red [31], BAc [32], LB, and MM9 [28], and others. The growth of the strains was assayed in these media supplied with different antibiotics and concentrations of them. Media used for selection were BAc CTX⁵⁰ (Cefotaxime 30 µg/ml) for *Acinetobacter* sp. EMM02, Congo Red Cro50 (Ceftriaxone 50 µg/ml) for *A. brasiliense* Sp7, MM9- citrate Cm¹⁵⁰ for *P. putida* KT2440, and Luria Bertani modified with only 5% of components AK⁵⁰ (Amikacin 50 µg/ml).

Desiccation tolerance of the strains selected for the bacterial consortium in different types of soils

Two types of substrate, sandy soil and loamy sandy soil, were used to perform desiccation experiments. The physicochemical characteristics of the soils were determined as in previous studies [14]. A bacterial suspension was obtained as indicated in the section "Bacterial desiccation assays", and the number of cultivable cells was quantified in quintuplicate using the MSDP method with SYP medium plates. For each strain, thirty sterile Eppendorf tubes were filled with 500 mg of experimental soil plus 500 µL of the bacterial suspension; they were mixed using strong agitation and covered with a sterile cotton cap. Treatments composed of 500 µL of bacterial suspension without soil for support were included. All tubes were placed in a desiccation chamber at 30°C and 55% Relative Humidity (RH). The water in each tube was completely evaporated 5 days after placing the tubes in the desiccation chamber. The counting of cultivable cells was performed every three days for a period of twelve days using the MSDP method. For the samples of 3 DABD, five tubes were used for counting, adjusting the liquid volume of each tube to the initial 500 µL. For the completely desiccated samples (6, 9, and 12 DABD), 500 µL of water was added to the cells, and after 40 min of occasional shaking, rehydration was achieved.

Determination of the PGPR characteristics of the bacterial consortium

Phosphate solubilization was done in Pikovskaya broth medium supplemented with broth containing 5 g/L of Ca₃(PO₄)₂ after 5 days of culture growth at 30°C [33,34].

Indole compounds were estimated using the colorimetric assay based on the Salkowski reagent and using the PC reagent and K-lactate medium supplemented with tryptophan (100 ppm) [14,35].

The siderophore content was determined according to the fast and universal method involving chrome azurol S (CAS) with an overlay technique in which a modified O-CAS medium is layered over culture agar plates [36]. The bacteria were grown on LB agar plates for

48 h at 30°C, and then one layer was treated with 30 mL of O-CAS medium without nutrients and incubated at 30°C for 15 min. Subsequently, change in color from blue to orange was observed around the growth of the siderophore-producing bacterial strains.

Seed inoculation procedure

Bacterial cells were grown in PY-Ca medium until the stationary phase was attained; the cells were harvested using centrifugation, washed twice and resuspended in sterile water at the same initial volume (100 mL). The bacterial consortium was formulated with 25 mL of each washed bacterial suspension. The number of cells was determined in quintuplicate using the MSDP method with selective solid media (S3 Table). The seeds were washed with sterile water, rinsed with 70% ethanol for 10 min, immersed in 6.5% sodium hypochlorite, and agitated for 20 min; afterward, the seeds were washed eight times under sterile conditions [37]. One hundred thirty-five seeds of blue maize were soaked in each bacterial suspension (*A. brasilense* Sp7, *P. putida* KT2440, *Acinetobacter* sp. EMM02, *Sphingomonas* sp. OF178 and the bacterial consortium) for 60 min. Non-inoculated seeds were included as a control, and they were soaked in distilled sterile water for 60 min. The inoculated seeds were subjected to two experimental conditions before sowing: without desiccation stress (Exp. 1) or with desiccation stress (Exp. 2), following which seeds from both treatments were used in growth promotion assays.

Experiment 1. Inoculated seeds without desiccation stress. Fifty seeds from each inoculation treatment were sown in pots containing 650 g of sterile vermiculite. Five hundred milliliters of sterile liquid MS [38] and 200 mL of water were added to each pot. All pots were placed in a greenhouse under 16 hours of light and a temperature of 30°C during the daytime and 8 hours of dark and a temperature of 25°C during the night. The plants were grown for 45 days and watered regularly with distilled water.

Experiment 2. Inoculated seeds with desiccation stress. Eighty-five seeds from each inoculation treatment were placed into Petri dishes containing dry sterile filter paper (Whatman No. 1). The dishes containing seeds were placed in a desiccation chamber at 30°C, 55% RH. Water was completely lost at 1 DABD under these conditions. Every three days after the beginning of desiccation, five seeds were removed from the desiccation chamber. Each one was placed in a 15 mL capacity tube containing 3 mL of sterile water for 2 h, and the tubes were vigorously agitated using a vortex. The number of cultivable bacteria was quantified using the MSDP method, and the BSR was calculated. Eighteen days after the beginning of desiccation (DABD), 50 inoculated seeds from each treatment and 50 non-inoculated seeds were sown in pots containing 650 g of sterile vermiculite and supplemented with 500 mL of sterile liquid MS medium [4,38] and 200 mL of water. Under these conditions, the bacteria associated with the seeds were rehydrated. The pots of all treatments were placed in a greenhouse with 16 hours of light and a temperature of 30°C during the daytime and 8 hours of dark and a temperature of 25°C during the night. The plants were grown for 45 days and watered regularly with distilled water.

Adherence and colonization assays

The bacterial cells that had adhered to the seed surfaces were quantified 12 h after being sown in vermiculite for both experiments 1 and 2; five replicates of inoculated seeds from each treatment were extracted from the pots containing vermiculite and vigorously vortexed in 3 mL of sterile water [4]. Each generated suspension was used to determine the bacterial number using the MSDP method with agar plates containing selective media [29].

Rhizospheric colonization was evaluated for all treatments of experiments 1 and 2. Briefly, five plants from each treatment were harvested from the pots at fifteen, thirty and forty-five

days after inoculation. The roots were shaken to discard non-adhered vermiculite. The roots of each plant with strongly adhered vermiculite were immersed in enough sterile water to cover the roots and shaken vigorously. The bacterial suspension was used to quantify the rhizospheric bacteria using the MSDP method. The weight of the vermiculite was obtained by drying samples without the roots as previously described [4]. Bacteria were inoculated onto selective media plates for the quantification of each experimental species, and incubation was carried out for 24 h at 30°C [37].

Measurement of plant growth parameters

After 45 days, the plants were removed from the vermiculite and washed with water, and the excess water was dried using absorbent paper. The shoot was measured using a tape measure to obtain the diameter and plant height. The fresh weight of the seedlings was determined with the help of an analytical balance; thereafter, the samples were oven dried at 75°C to a constant dry weight, and the dry weight data were recorded. The same procedure was used for both experiments.

Genomic DNA extraction, amplification of genes encoding 16S rRNA and restriction patterns

The DNA of the strains was extracted using a genomic DNA purification kit (PROMEGA).

From each sample of extracted DNA, the gene encoding 16S rRNA was amplified using PCR with the conserved primers fD1: 5'-AGAGTTTGATCCCTGGCTCAG-3' and rD1: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3' [39], which amplify almost the full length of the 16S rRNA gene (1500 pb), and the Master MIX reagent (Invitrogen). Amplification was performed as described in [4]. PCR amplification was verified by agarose gel electrophoresis, and the amplified genes were purified using a PCR purification kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

For each reference strain and strain isolated from the rhizosphere, the amplified gene encoding 16S rRNA was digested with 5 U of different restriction enzymes (*AluI*, *HhaI*, *HinfI*, *RsaI*, *MboI* and *MspI*). The lengths of the restriction fragments generated for each tested strain were determined by electrophoresis in 2% agarose gels using a commercial molecular weight marker (100 bp DNA ladder), and the patterns of the isolated strains were compared with those of initially inoculated reference strains [4,37,40].

Statistical analysis

The statistical analysis of desiccation tolerance, bacterial consortium compatibility, and plant growth parameters was performed using SigmaPlot (Handel Scientific Software). Differences were evaluated according to Student's *t* and Tukey's tests. The results of the Student's *t*-test comparison were used to generate a matrix of differences and similarities between treatments for the assignment of letters. For Tukey's test, the data were analyzed globally by one way ANOVA, and comparisons were carried out with Tukey's test.

Results and discussion

The design, formulation and optimization of effective bacterial consortiums as inoculants require studies of co-interaction among members of the consortium, bacterial adhesion to seeds, plant root colonization and the ability of the bacteria to promote plant growth [1,11,41]. However, some environmental factors could affect the effectiveness of an inoculant, such as soil type [42,43], the variety and physiology of plants [40,43,44], salinity [40], water availability

[17,40] and others. Bacterial coexistence is essential for the formulation of stable bacterial consortiums [15]. Bacteria may coexist if they do not produce inhibitory substances against one another, but some strains that produce such inhibitory substances could still coexist with resistant strains.

Antagonism assays for the selection of compatible bacteria

In the present work, twenty bacterial strains belonging to the genera *Azospirillum*, *Acinetobacter*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Paraburkholderia*, *Pseudomonas*, and *Sphingomonas* (S1 Table) were used to evaluate antagonistic activity. They were tested as producers of antagonistic substances and as indicator strains (Table 1). *Rhizobium* sp. MS24 and *Bradyrhizobium* sp. MS13 were inhibited by 5 and 7 of the tested bacteria, respectively. In contrast, *Sphingomonas* sp. DS204 showed a broad spectrum of inhibition toward the majority of the tested bacteria. Thus, those bacteria were not considered in further experiments because of their high sensitivity or strong inhibitory effect, as such characteristics make them incompatible and unable to work together in a microbial consortium. Among the other seventeen strains, 11 could be able to coexist since they did not show antagonistic effects on the growth of the examined bacterial strains (Table 1). In addition, *Acinetobacter* sp. EMM02, *P. putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. GOF-203, *Sphingomonas* sp. DS-201, *P. putida* DOT-T1E, and *Enterobacter* sp. UAPSO3001 showed antagonistic effects toward some strains, but they could still be compatible with the majority of bacterial strains considered in this work (Table 1). Therefore, we consider these 17 strains with the potential of

Table 1. Antagonism assays using the double agar layer method.

Bacterial strains explored as producer	Bacterial strains explored as sensitive																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>Acinetobacter</i> sp. EMM02			P				P	P	P			P				P				
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7																				
<i>Bradyrhizobium</i> sp. MS13																				
<i>Bradyrhizobium</i> sp. MS21																				
<i>Bradyrhizobium</i> sp. MS22																				
<i>Bradyrhizobium</i> sp. MS23																				
<i>Enterobacter</i> sp. UAPSO3001		P	P													P				
<i>Paraburkholderia tropica</i> MOc-725																				
<i>Paraburkholderia tropica</i> MTc-293																				
<i>Paraburkholderia tropica</i> MTc-672																				
<i>Paraburkholderia tropica</i> Pp8 ^T																				
<i>Paraburkholderia unamae</i> MT1-641 ^T																				
<i>Paraburkholderia unamae</i> ScCu 23																				
<i>Pseudomonas putida</i> DOT-T1E				P													P			
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440				P				P	P	P			P				P			
<i>Rhizobium</i> sp. MS24																				
<i>Sphingomonas</i> sp. DS-201				P													P			
<i>Sphingomonas</i> sp. DS-204	P	P	P	P	P	P	P	P	P		P	P	P		P	P	P	P		P
<i>Sphingomonas</i> sp. GOF-203				P													P			
<i>Sphingomonas</i> sp. OF-178A																				

P means that producer strain inhibited the growth of the strain tested as sensitive (designated with the corresponding number listed in the column). Empty boxes mean that the strain tested as sensitive was not inhibited by the strain explored as possible producer.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187913.t001>

being part of specific bacterial mixtures because they could coexist; considering their inhibitory relationship.

Bacterial tolerance to desiccation

A lack of water availability in the field decreases the survival of bacteria on inoculated seeds, and this is an important limitation in terms of their positive effects on plant growth promotion [17,40]. In fact, desiccation-tolerant bacteria are able to promote the growth of plants under adverse conditions, as has been reported for *Pseudomonas* spp. and *Viridibacillus arenosus* IHB B7171 after the inoculation of seeds of maize and seedlings of tea, peas and wheat [45]. Other desiccation-tolerant bacteria, such as *Microbacterium* sp. 3J1 and *Arthrobacter koreensis* 5J12A, promote the growth of pepper, showing a correlation between the degree of tolerance to desiccation and the level of protection to drought that they provide to the plant [46].

Seventeen compatible strains that were previously selected as described earlier in this work were used to perform desiccation experiments (30 °C, 50% HR). The bacterial strains exhibited different levels of tolerance to desiccation stress 12 days after the beginning of desiccation (DABD) (Table 2). Our results show that some strains were highly tolerant (i.e., *A. brasilense* Sp7, *Acinetobacter* sp. EMM02, and *Sphingomonas* sp. OF178), others were moderately tolerant (i.e., *Sphingomonas* sp. GOF203, *P. putida* KT2440 and *Bradyrhizobium* sp. MS23), and some strains were only slightly tolerant (i.e., *P. unamae* ScCu23) (Table 2). Only three strains were highly sensitive to desiccation (*P. tropica* MT0-672, *P. tropica* M0c-725, and *P. unamae* ScCu23), and they were not included in further studies. Other studies have also shown that PGPR strains can tolerate desiccation at different levels, for example, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 R can resist 2 days of desiccation [47], while *Bradyrhizobium japonicum* tolerates 3 days of desiccation [48,49]. The ability to tolerate desiccation has been reported for

Table 2. Bacterial survival ratio (BSR) of bacterial strains after desiccation stress.

Strain	0 DABD	3 DABD	6 DABD	9 DABD	12 DABD
<i>Acinetobacter</i> sp. EMM02	100	99.6±1.7 a	98.9±1.1 a	97.2±1.2 a	92.4±0.7 a
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	100	99.0±1.2 a	96.5±1.9 a	95.5±0.8 b	90.0±1.1 b
<i>Bradyrhizobium</i> sp. MS21	100	99.0±0.8 a	94.1±1.9 b	91.1±0.9 b	86.1±1.6 c
<i>Bradyrhizobium</i> sp. MS22	100	95.2±2.2 b	88.4±1.9 c	87.6±2.3 c	85.7±0.6 c
<i>Bradyrhizobium</i> sp. MS23	100	86.2±1.0 b	85.4±1.9 c	77.8±0.5 e	74.8±1.0 e
<i>Enterobacter</i> sp. UAPSO3001	100	97.0±1.8 b	95.0±1.9 b	94.1±0.8 b	93.5±0.8 a
<i>Paraburkholderia tropica</i> M0c-725	100	76.0±2.4 d	50.0±1.2 f	ND	ND
<i>Paraburkholderia tropica</i> MT0-293	100	99.4±0.6 a	88.2±1.9 c	86.6±1.0 c	83.2±0.8 d
<i>Paraburkholderia tropica</i> MT0-672	100	93.1±1.8 b	61.0±2.3 e	ND	ND
<i>Paraburkholderia tropica</i> Pp8T	100	91.6±2.4 b	93.1±1.9 b	88.7±2.4 c	86.7±1.4 c
<i>Paraburkholderia unamae</i> MT1-641 ^T	100	96.5±0.5 b	89.0±1.9 c	87.3±2.4 c	82.0±1.1 d
<i>Paraburkholderia unamae</i> ScCu23	100	81.4±2.5 c	60.0±2.2 e	ND	ND
<i>Pseudomonas putida</i> DOT-11E	100	99.5±0.9 a	99.1±1.1 a	97.7±1.0 a	82.0±1.8 d
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	100	87.3±1.7 c b	83.1±0.7 d	73.5±0.9 e	60.0±0.9 f
<i>Sphingomonas</i> sp. DS-201	100	99.3±1.1 a	97.3±1.9 a	96.0±2.0 a	85.7±1.1 c
<i>Sphingomonas</i> sp. GOF-203	100	88.2±1.3 b	86.6±1.9 c	82.3±1.6 d	74.7±0.9 e
<i>Sphingomonas</i> sp. OF-178A	100	97.0±0.9 b	92.8±1.9 b	91.8±1.7 b	89.6±0.8 b

DABD means days after the beginning of desiccation. Values represent the media of five independent determinations and the respective standard deviation. Values with identical letters in the same column are not significantly different at $p \leq 0.05$, as determined using Student's *t* and Tukey's tests. ND means that bacterial growth was not detected. Bold letters indicate the bacterial strains chosen for the bacterial consortium formulation.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187913.t002>

other PGPR, such as *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium leguminosarum* and *B. japonicum* [17,50].

Selection of bacterial strains to formulate the consortium

According to the results of Tables 1 and 2, several strains could be chosen to design a formulation containing several bacterial species. In this work, three selection criteria were used to formulate the bacterial consortium: ability to coexist, resistance to desiccation and potential to promote plant growth as supported by the literature [9,51]. Therefore, four compatible strains were selected to formulate the bacterial consortium; three that are highly tolerant to desiccation (*A. brasilense* Sp7, *Acinetobacter* sp. EMM02, and *Sphingomonas* sp. OF178) and one that is moderately tolerant (*P. putida* KT2440). Despite its moderate desiccation tolerance, *P. putida* KT2440 was included in the formulation because of its well-known biotechnological and agronomic potential [8,9,51,52].

It is important to highlight that *Acinetobacter* sp. EMM02 was isolated and characterized for the first time in this work (S1 Fig and S2 Table). This strain was partially characterized through the amplification and sequencing of the gene encoding 16S rRNA. Sequence analysis allowed the identification of this strain as part of the genus *Acinetobacter* and being closely related to *Acinetobacter calcoaceticus* (> 98% identity, S2 Table) and *Acinetobacter rhizosphaerae* (98% identity, S2 Table).

Compatibility of the strains selected for the bacterial consortium under different growing conditions

The composition of the culture medium can affect the production of inhibitory substances [53,54] and consequently the establishment of antagonistic relations among microorganisms [24,30]. The validation of the compatibility of the strains selected to formulate the bacterial consortium was performed using growth curves under different culture conditions to evaluate any inhibitory relationships. Thus, studies of antagonism were performed using a double agar layer with solid PY-Ca medium (Table 1), and assays in liquid SYP and PY-Ca media (S2 Fig). The four strains grew successfully in co-culture, showing that they were compatible independently of the culture medium conditions and suggesting that these strains could also be compatible in association with plants.

Influence of soil type on the desiccation tolerance of the bacterial strains selected for the bacterial consortium

Bacteria-plant interactions are influenced by soil type [55,56] and likely the bacterial tolerance to desiccation as well. To determine whether soil type affects bacterial tolerance to desiccation, loamy sand and sand were used as substrates to evaluate the survival of the four bacterial strains in response to desiccation. The composition of these two substrates was analyzed using physicochemical assays (S3 Fig). Interestingly, *Acinetobacter* sp. EMM02 was highly resistant to desiccation independently of soil used (Fig 1). The survival of *A. brasilense* Sp7, *P. putida* KT2440 and *Sphingomonas* sp. OF178 in sand was lower than that in loamy sand or the water control, but a high number of bacteria was still found at the end of the desiccation experiment. The tolerance to desiccation of *A. brasilense* Sp7 and *P. putida* KT2440 in loamy soil was similar to that observed in the control (Fig 1). Despite a decrease in bacterial survival observed in the sandy soil for *A. brasilense* Sp7, *P. putida* KT2440 and *Sphingomonas* sp. OF178, it is worth mentioning that none of the bacteria in the formulation decreased to non-detectable numbers, which ensures the presence of bacteria even after desiccation stress.

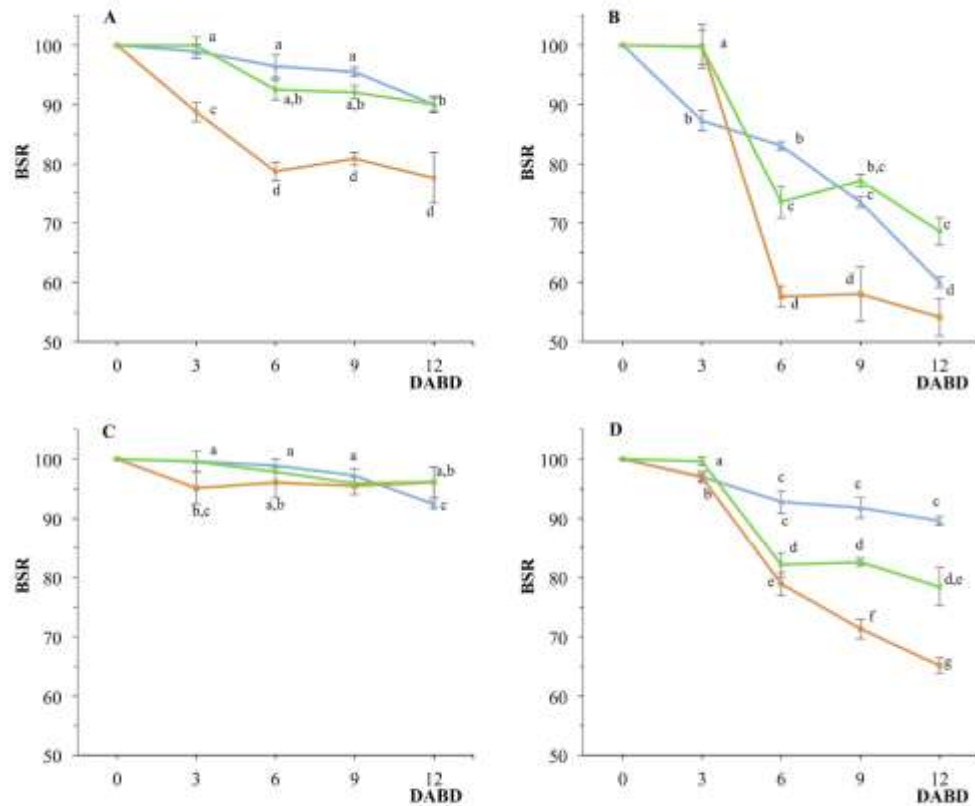


Fig 1. Bacterial survival ratio (BSR) response to desiccation stress using soils as support matrices for desiccation. A) *A. brasilense* Sp7, B) *P. putida* KT2440, C) *Acinetobacter* sp. EMM02, D) *Sphingomonas* sp. OF17B. Green lines indicate desiccation using loamy sand for support, red lines indicates desiccation using sand for support, blue lines indicate bacterial desiccation without soil (control). Each point in each graph represents the mean of five independent determinations and the respective standard deviation. Values with identical letters in each graphic are not significantly different at $p < 0.05$ based on Student's *t* or Tukey's test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187913.g001>

PGPR potential of the strains selected for the consortium

The four strains selected for the consortium showed high potential as PGPR (Table 3). They were able to produce siderophores (S4 Fig) and indole acetic acid (IAA) and perform phosphate solubilization (Table 3).

Azospirillum brasilense Sp7 was used as control strain for determination of the PGPR characteristics, because it is known that this bacterium has the activities tested [57–59].

The mechanisms of plant growth promotion in bacteria closely related to the strains chosen in our work have been previously reported. For example, the production of IAA, a hormone for plant growth stimulation, has been described for *A. brasilense* [57], *Acinetobacter rhizosphaerae* Strain BIHB 723 [34] and *P. putida* GN04 [6]. Phosphate solubilization can be carried out by *A. brasilense* [59], *P. putida* GN04 [8] and *A. rhizosphaerae* Strain BIHB 723 [34]. Indirect mechanisms to promote plant growth, such as antagonism of pathogens, have also been

Table 3. Plant growth-promoting features of bacteria used for inoculant formulation.

Strain	Siderophores (halo mm)	Phosphates solubilization (halo mm)	Indole compounds (µg IAA/mg protein)
<i>Acinetobacter</i> sp. EMM502	15.0 ±0.8	4.0 ±0.6	24.0 ±0.8
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	10.0 ±0.5	1.0 ±0.5	32.7 ±1.5
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	20.0 ±0.5	4.0 ±0.7	8.0 ±0.6
<i>Sphingomonas</i> sp. OF-178A	15.0 ±0.4	3.0 ±1.2	4.0 ±0.8
Bacterial consortium	17.0 ±0.4	5.0 ±0.5	9.5 ±0.4

Values represent the media of five independent determinations and the respective standard deviation. *A. brasilense* Sp7 was used as the control strain, IAA (Indole Acetic Acid). *A. brasilense* Sp7 was used as the control strain.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187913.t003>

reported for *P. putida* KT2440 [8] and *A. brasilense* [34]. Siderophore production has been reported for *P. putida* KT2440 [9,51] and *A. brasilense* Sp7 [60]. *P. putida* KT2440 may also antagonize the anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*, associated with maize plants, by triggering induced systemic resistance (ISR) [9].

Adhesion of bacteria to the seeds is the first step in PGPR-plant interactions [9,56], and the colonization of beneficial bacteria is fundamental to obtaining positive results in terms of the growth of plants caused by bacterial inoculation [9]. Desiccation stress in bacteria associated with seeds could influence the capability of bacteria to maintain adhesion or to carry out rhizospheric colonization. In the present work, the ability of bacteria (individually or in a bacterial consortium) to perform adhesion, colonization and plant growth promotion was evaluated under two experimental conditions before sowing the inoculated seeds: inoculated seeds without desiccation stress and inoculated and desiccated seeds.

Bacterial inoculation of maize seeds (without desiccation stress) and its effect on plant growth (Exp. 1)

The number of bacteria was quantified for the consortium or individual bacterial suspensions used in this experiment, and the results are shown in S3 Table.

The four strains showed good adhesion to the seeds for both mono-inoculation and co-inoculation (bacterial consortium). The number of bacteria that adhered to maize ranged from 10^5 to 10^7 CFU/seed (S4 Table). The adhesion of *P. putida* KT2440 to blue maize seeds was similar to that observed for hybrid maize (var. Golden Jubilee, West Coast Seeds, Canada) [61].

A. brasilense Sp7, *Acinetobacter* sp. EMM02, *Sphingomonas* sp. OF178, and *P. putida* KT2440 also showed good colonization in the plant rhizosphere in both individual inoculations and the bacterial consortium. The presence of bacteria in the rhizosphere was detected during the development of the plants, as shown by the data from 45 days after sowing (DAS). Bacterial colonization of the plants inoculated with the bacterial consortium was similar to that observed for the mono-inoculated plants (S5 Table). The bacterial populations associated with the rhizosphere were observed in the range of 10^5 to 10^8 CFU/g vermiculite (V) for *A. brasilense* Sp7, *P. putida* KT2440, *Acinetobacter* sp. EMM02 and *Sphingomonas* sp. OF178 for both the single bacterial inoculations and the bacterial consortium inoculation.

The number of bacteria colonizing the rhizosphere has been reported for several bacteria, for example, *Burkholderia* sp., *B. megaterium* and *Sphingomonas* sp. colonize the rhizosphere of corn plants with counts of 10^4 CFU/g fresh soil after 5 weeks of plant growth [61], and *P. fluorescens* colonizes corn roots at populations of 10^5 CFU/g in the rhizosphere after five weeks of plant growth [62].

The effects of single and multi-inoculation on the growth of maize plants were evaluated at 45 DAS under greenhouse conditions. It was observed that plants inoculated with individual strains (*P. putida* KT2440, *A. brasilense* Sp7, *Acinetobacter* sp. EMM02 and *Sphingomonas* sp. OF178) significantly increased in height and shoot and root dry weight with respect to non-inoculated plants (Fig 2C, 2A and 2B). There were no differences in the diameter of mono-inoculated plants and non-inoculated controls, except in the case of *P. putida* KT2440 inoculation (Fig 2D). Plants inoculated with the bacterial consortium always showed higher values of growth parameters compared to mono-inoculated plants or control plants (Fig 2). The shoot dry weight of plants inoculated with the bacterial consortium was 75% higher than that of control plants. In the same way, root dry weight, plant height, and stem diameter were 59%, 22%, and 12% higher in plants inoculated with the bacterial consortium than in non-inoculated controls (Fig 2). In general, bacterial consortium inoculation showed greater plant growth promotion and enhanced the appearance of plants compared to the non-inoculated controls (Fig 2A–2E).

The interaction among bacterial strains in the consortium could have a synergistic effect and improve plant performance, as was previously reported [63,64]. For instance, the inoculation of sugarcane with a bacterial consortium of five diazotrophic strains (*G. diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense*, and *P. tropica*) increases stem production [42]. The inoculation of chickpea and wheat plants with bacterial consortiums promotes higher plant growth than mono-inoculation [11,61]. The inoculation of tomato seeds with two strains of *P. fluorescens* and an arbuscular mycorrhizal fungus synergistically increases tomato growth compared to individual inoculation with each microorganism [64]. Furthermore, maize inoculated with an arbuscular mycorrhizal fungus and a PGPR consortium showed increases in the mineral nutrient content in leaves and biomass production [13]. Our data are in agreement with those results; seed inoculation with a bacterial consortium improved the growth of native blue maize compared to mono-inoculated plants and non-inoculated plants.

Desiccation of inoculated seeds and its effect on plant growth (Exp. 2)

The number of bacteria of each strain present in the consortium or individual suspensions used in the second experiment is shown in S3 Table. Blue maize seeds were inoculated with single bacterium suspensions or the bacterial consortium and then placed into a desiccation chamber for eighteen days before being sown. The BSR of strains associated with seeds was calculated (Fig 3). In this experiment, *A. brasilense* Sp7, *Acinetobacter* sp. EMM02 and *Sphingomonas* sp. OF178 showed high tolerance to desiccation, and *P. putida* KT2440 was not detected after 12 DABD (days after the beginning of desiccation). For mono-inoculated seeds, the BSR values at 18 DABD were 66, 85, 94.5, and 0 for *A. brasilense* Sp7, *Acinetobacter* sp. EMM02, *Sphingomonas* sp. OF178 and *P. putida* KT2440, respectively (Fig 3A). Values of tolerance to desiccation of the seeds inoculated with the bacterial consortium at 18 DABD were 56, 59, 89 and 0, respectively (Fig 3B).

The survival of the three highly tolerant bacteria associated with seeds was similar in mono- and co-inoculations (Fig 3). In contrast, *P. putida* KT2440 in the co-inoculation showed higher tolerance (BSR of 78 at 9 DABD) than in the mono-inoculations (BSR of 0 at 9 DABD). Apparently, mixed inoculation allowed *P. putida* KT2440 to increase its tolerance to desiccation.

The adhesion of desiccated bacteria to seeds was evaluated 12 hours after sowing; it was observed that the three highly tolerant strains (*A. brasilense* Sp7, *Acinetobacter* sp. EMM02 and *Sphingomonas* sp. OF178) were present in high numbers for both the single and mixed inoculations (S4 Table). Under both tested conditions (Exp. 1 and 2), adhesion of bacteria was

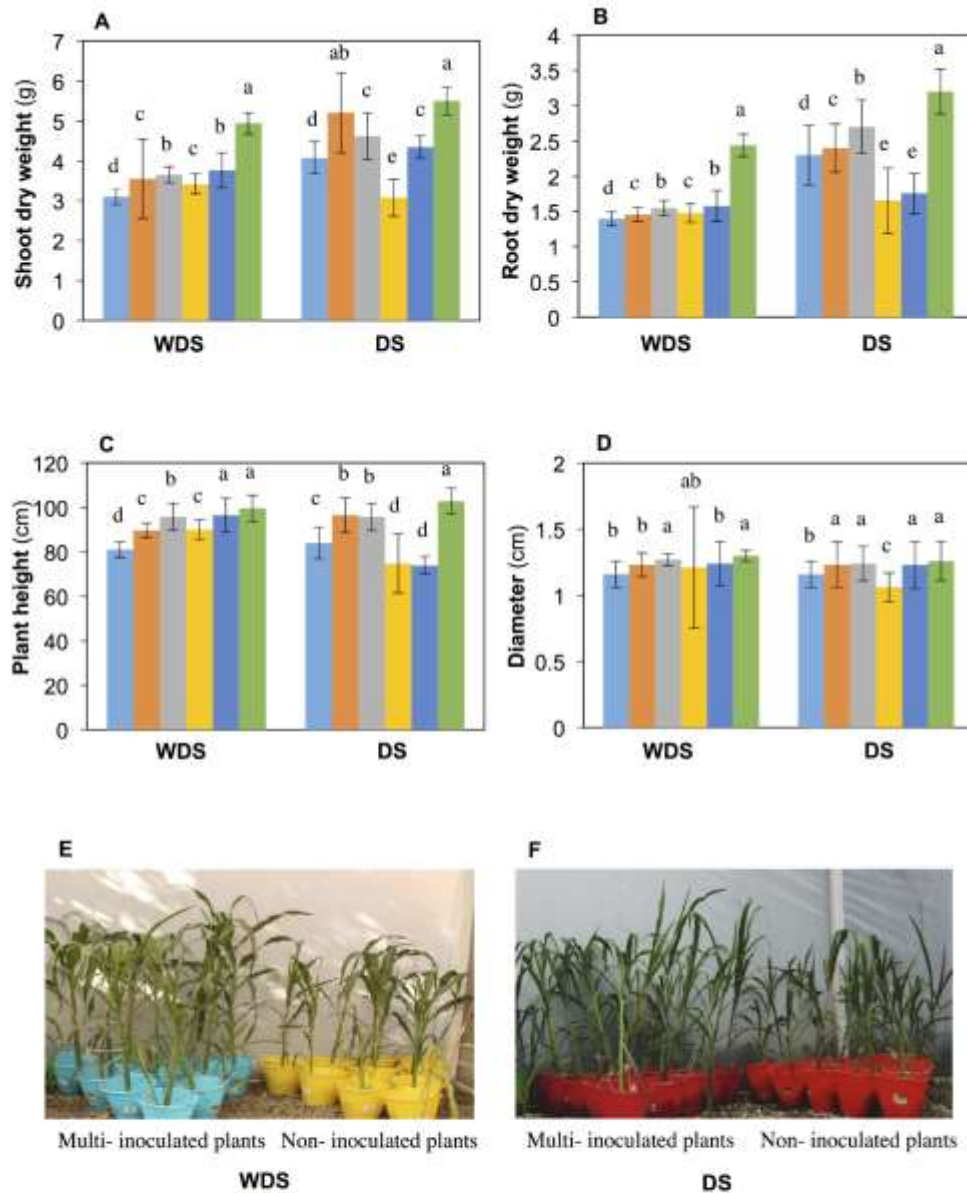


Fig 2. Effect of bacterial inoculation on the growth of maize 45 days after sowing (DAS) under greenhouse conditions. A) Shoot dry weight, B) Root dry weight, C) Plant height, D) Plant diameter. WDS indicates experiment with seeds not subjected to desiccation stress before germination (Exp. 1). DS indicates experiment with seeds subjected to desiccation stress before germination (Exp. 2). E) Plants from germinated seeds inoculated with the bacterial consortium (WDS). F) Plants from germinated seeds inoculated with the bacterial consortium (DS). Bar color key: sky blue, non-inoculated control; orange, *A. brasilense* Sp7; gray, *P. putida* KT2440; yellow, *Acinetobacter* sp. EMM02; dark blue, *Sphingomonas* sp. OF178; green/bacterial consortium. Each value represents the media of the data for 35 independent plants with the respective standard deviation. Identical letters in each bar group indicate that the values were not significantly different at $P \leq 0.05$ based on Student's *t* or Tukey's test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187913.g002>

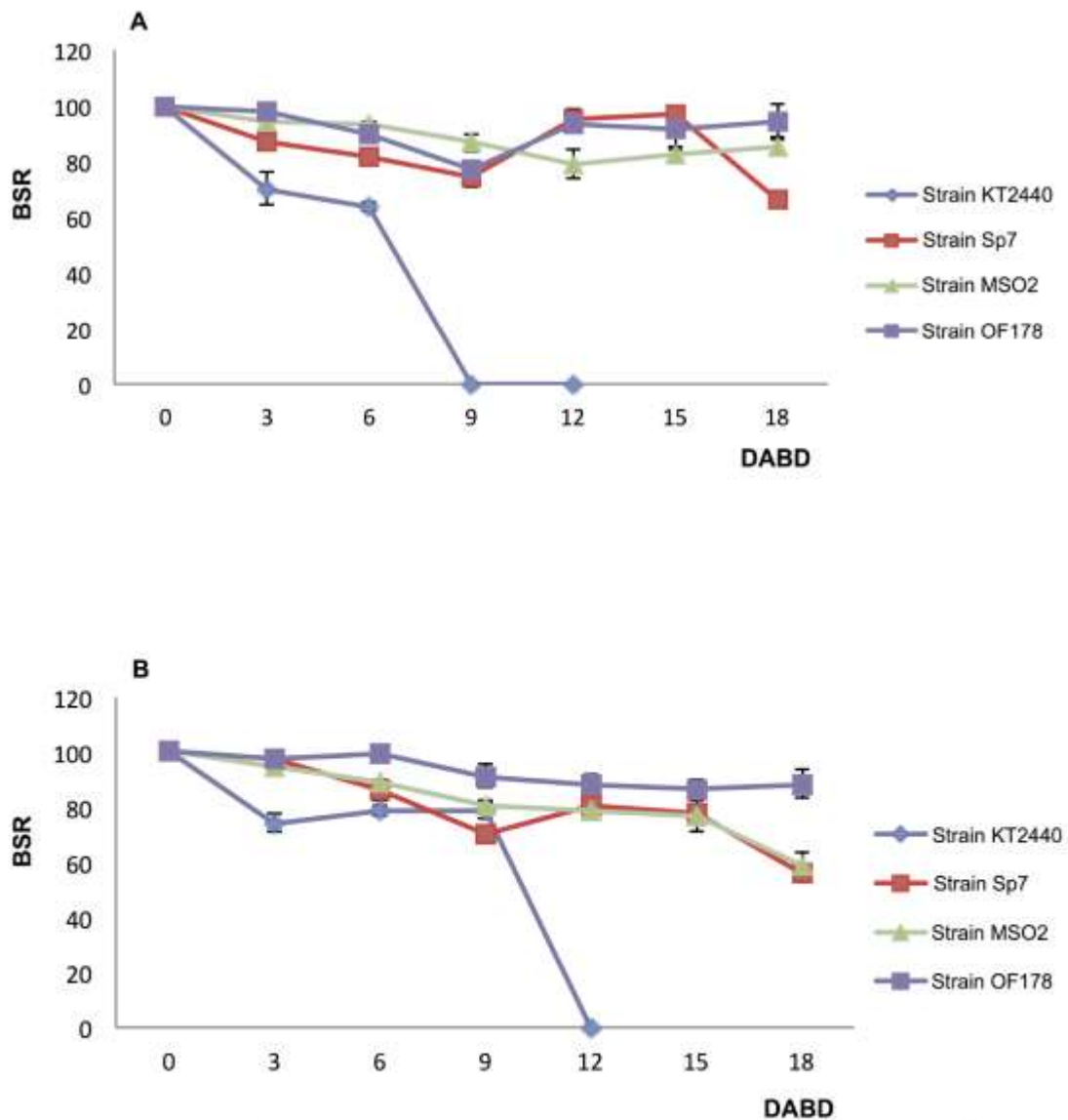


Fig 3. Bacterial survival ratio (BSR) of bacteria associated with blue maize seeds subjected to 18 days of desiccation. Fig 3A, BSR determination for seeds inoculated with single bacterial strains. Fig 3B, BSR determination for seeds inoculated with the bacterial consortium. Purple squares represent *Sphingomonas* sp. OF178, green triangles represent *Acinetobacter* sp. EMM02, red rectangles represent *A. brasilense* Sp7, and blue diamonds represent *P. putida* KT2440.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187913.g003>

successful in acceptable numbers, except in the case of *P. putida* KT2440, which was not detected in Exp. 2.

Similar to Exp. 1, in Exp. 2, the rhizospheric colonization by the four strains showed high numbers in both the individual inoculations and multi-inoculation. The number of bacteria detected in the rhizosphere during plant development ranged from 10^3 to 10^6 CFU/g V (S5 Table). The bacterial colonization of plants inoculated with the bacterial consortium was similar to that observed for the mono-inoculated plants (S5 Table).

In Exp. 2, *P. putida* KT2440 was not detected on seeds after 12 DABD nor during adhesion following rehydration. Interestingly, this bacterium was detected colonizing the rhizosphere of plants in numbers of approximately 10^6 CFU/g V at any of three stages of plant growth evaluated. Most likely, during the desiccation process, *P. putida* KT2440 goes into a viable but non-culturable (or non-cultivable) state and returns to a cultivable state after the interaction with the maize rhizosphere. This viable but non-culturable state has been reported for *P. putida* KT2440 in the Pasteurization process, suggesting that it can be returned to a cultivable state when environmental conditions do not cause stress to the microorganism, allowing it to maintain an optimal level of metabolic activity [65]. On the other hand, the metabolic capacity of *P. putida* F1 allows it to tolerate different stresses by entering metabolic states that are viable but not culturable (VBNC) and exhibiting near zero growth (NZG) [66].

The rhizospheric bacterial populations of the four strains evaluated in the present work were maintained throughout the durations of Exp. 1 and Exp. 2, indicating that these bacteria can coexist without antagonistic effects in association with plants.

The identities of some rhizospheric strains isolated from the inoculated plants in Exp. 1 and 2 were corroborated. For this, the gene encoding 16S rRNA was amplified, and then a restriction pattern was generated with the restriction enzymes *AluI*, *HhaI*, *HinfI*, *RsaI*, *MboI* and *MspI*. Due to *MspI* showed the restriction pattern with higher resolution of bands (S5 Fig), this enzyme was used for the corroboration of patterns of rhizospheric isolated strains. The rhizospheric strains evaluated for identification showed identical restriction patterns to those observed for the initially inoculated reference strains.

The plants inoculated with single strains in Exp. 2 showed a higher shoot dry weight than control plants at 45 DAS, except for *Acinetobacter* sp. EMM02 (Fig 2A). Compared to non-inoculated control plants, only mono-inoculation with *A. brasilense* Sp7 or *P. putida* KT2440 resulted in a higher root dry weight (Fig 2B). These results contrast with those for Exp. 1 (without desiccation stress), in which all strains inoculated individually were able to promote the growth of plants.

In Exp. 2, plants inoculated with the bacterial consortium showed a greater plant height and shoot and root dry weight than non-inoculated or mono-inoculated plants (Fig 2A–2C and 2E). The diameter of plants inoculated with the consortium was 8% higher than that of control plants. Plants inoculated with the bacterial consortium generally showed higher values of growth parameters than mono-inoculated plants, except for diameter (Fig 2D). Although the bacterial consortium underwent a desiccation process, it maintained its ability to promote the growth of maize after rehydration, showing its potential to increase plant growth, even under low water availability.

Other consortiums of bacteria that are resistant to desiccation also promote the growth of plants, for example, a consortium for maize composed of *Pseudomonas entomophila* GAP-P13, *Pseudomonas stutzeri* GRFHAP-P14, *P. putida* GAP-P45, *Pseudomonas syringae* GRFHYP52 and *Pseudomonas monteilii* WAPP53 [46] and a consortium for pepper composed of *Microbacterium* sp. 3J1 and *Arthrobacter koreensis* 5J12A [46].

This work is one of the few studies showing the synergistic effects of a bacterial consortium on maize in terms of the promotion of plant growth and is the first showing the stimulation of

native blue maize CAP15-1 TLAX. In our laboratory, other bacterial consortiums have been formulated with 5 or 6 bacterial strains that are able to coexist and have the ability to tolerate desiccation. Even though those formulations increase the growth of other plants, they do not increase the growth of blue maize plants, highlighting the importance of the bacterial consortium formulated with *P. putida* KT2440, *A. brasilense* Sp7, *Acinetobacter* sp. EMM02, and *Sphingomonas* sp. OF178.

Further studies will be necessary to determine which mechanisms are involved in the promotion of plant growth when these bacteria are interacting in the rhizosphere with native blue maize [67]. However, it is worth mentioning that *in vitro* assays of these four selected strains were positive for the production of indoles and siderophores and the solubilization of phosphates. These characteristics only suggest that all four strains could promote plant growth using these mechanisms.

Conclusion

The inoculation of seeds of native blue maize with a bacterial consortium containing *P. putida* KT2440, *A. brasilense* Sp7, *Acinetobacter* sp. EMM02, and *Sphingomonas* sp. OF178 improved plant growth more effectively than mono-inoculation. After the bacterial consortium undergoes a desiccation process, it maintains its ability to promote blue maize growth after rehydration, showing the potential for using this bacterial consortium to increase plant growth, even under low water availability before germination. Future efforts will be necessary to determine which mechanisms are responsible for growth promotion when the bacteria in the consortiums are associated with plants. Finally, this bacterial consortium presents desirable traits for future application in blue maize cultivation and perhaps that of other native varieties, contributing to sustainable agricultural practices.

Supporting information

S1 Fig. Flow chart illustrating the identification of *Acinetobacter* sp. EMM02 by the amplification and sequencing of the gene encoding 16S rRNA.

(PDF)

S2 Fig. Bacterial growth in SYP or PY-Ca liquid media for bacteria grown individually or all together.

(PDF)

S3 Fig. Physicochemical characteristics of the soils used for support in the desiccation experiments.

(PDF)

S4 Fig. Siderophore production of the four strains chosen for the bacterial consortium.

(PDF)

S5 Fig. Restriction patterns of the amplified gene encoding the 16S rRNA of the bacterial strains isolated from plants.

(PDF)

S1 Table. Strains used in this study.

(DOCX)

S2 Table. Sequence identity of 16S rRNA from *Acinetobacter* sp. strain EMM02.

(DOCX)

S3 Table. Number of bacteria present in suspensions used for the inoculation of maize.
(DOCX)

S4 Table. Adhesion of strains to maize seeds sown in vermiculite.
(DOCX)

S5 Table. Colonization of the rhizosphere of maize plants by the bacterial strains.
(DOCX)

Acknowledgments

We are grateful to CONACYT for the fellowship to Osvaldo Rodríguez-Andrade and Dalia Molina Romero.

Author Contributions

Conceptualization: Dalia Molina-Romero, Jesús Muñoz-Rojas.

Data curation: Dalia Molina-Romero, Verónica Quintero-Hernández, Yolanda Elizabeth Morales-García.

Formal analysis: Dalia Molina-Romero, Antonino Baez, Verónica Quintero-Hernández, Luis Ernesto Fuentes-Ramírez, Jesús Muñoz-Rojas.

Funding acquisition: Luis Ernesto Fuentes-Ramírez, Jesús Muñoz-Rojas.

Investigation: Dalia Molina-Romero, Antonino Baez, Verónica Quintero-Hernández, Yolanda Elizabeth Morales-García, Antonio Munive, Jesús Muñoz-Rojas.

Methodology: Dalia Molina-Romero, Miguel Castañeda-Lucio, Luis Ernesto Fuentes-Ramírez, María del Rocío Bustillos-Cristales, Osvaldo Rodríguez-Andrade, Yolanda Elizabeth Morales-García.

Project administration: Jesús Muñoz-Rojas.

Resources: Antonio Munive, Jesús Muñoz-Rojas.

Supervision: Antonino Baez, Verónica Quintero-Hernández, Miguel Castañeda-Lucio, Luis Ernesto Fuentes-Ramírez, Yolanda Elizabeth Morales-García, Jesús Muñoz-Rojas.

Validation: María del Rocío Bustillos-Cristales, Osvaldo Rodríguez-Andrade.

Writing – original draft: Dalia Molina-Romero, Antonino Baez, Verónica Quintero-Hernández, Jesús Muñoz-Rojas.

Writing – review & editing: Dalia Molina-Romero, Antonino Baez, Verónica Quintero-Hernández, Jesús Muñoz-Rojas.

References

1. Sundaramoorthy S, Raguchander T, Ragupathi N, Samiyappan R. Combinatorial effect of endophytic and plant growth promoting rhizobacteria against wilt disease of *Capsicum annuum* L. caused by *Fusarium solani*. *Biol Control*. Elsevier Inc.; 2012; 60: 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.10.002>
2. Myresiotis CK, Vryzas Z, Papadopoulou-Mourkidou E. Effect of specific plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on growth and uptake of neonicotinoid insecticide thiamethoxam in corn (*Zea mays* L.) seedlings. *Pest Manag Sci*. 2015; 71: 1258–1266. <https://doi.org/10.1002/ps.3919> PMID: 25257038
3. Masciarelli O, Ujanés A, Luna V. A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation. *Microbiol Res*. Elsevier GmbH; 2014; 169: 609–615. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.10.001> PMID: 24280513

4. Morales-García YE, Juárez-Hernández D, Aragón-Hernández C, Mascara-Esparza MA, Bustillos-Cristales MR, Fuentes-Ramírez LE, et al. Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter* spp., as a model for alternative agriculture. *Rev Argent Microbiol*. 2011; 43: 287–293 PMID: [22274827](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22274827/)
5. Ahmad M, Zahir ZA, Khalid M, Nazli F, Arshad M. Efficacy of *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains to improve physiology, ionic balance and quality of mung bean under salt-affected conditions on farmer's fields. *Plant Physiol Biochem*. Elsevier Masson SAS; 2013; 63: 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.11.024> PMID: [23262185](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23262185/)
6. Bhattacharyya PN, Jha DK. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol*. 2012; 28: 1327–1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9> PMID: [22805914](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22805914/)
7. Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2009; 63: 541–556. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918> PMID: [19575558](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19575558/)
8. Rojas-Tapias DF, Bonilla R, Dussán J. Effect of inoculation and co-inoculation of *Acinetobacter* sp. RG30 and *Pseudomonas putida* GND4 on growth, fitness, and copper accumulation of maize (*Zea mays*). *Water Air Soil Pollut*. 2014; 225. <https://doi.org/10.1007/s11270-014-2232-2>
9. Planchamp C, Glauser G, Mauch-Mani B. Root inoculation with *Pseudomonas putida* KT2440 induces transcriptional and metabolic changes and systemic resistance in maize plants. *Front Plant Sci*. 2015; 5: 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00719> PMID: [25628626](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25628626/)
10. Marks BB, Megias M, Nogueira MA, Hungria M. Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* inoculants with soybean and maize. *AMB Express*. 2013; 3: 21. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-21> PMID: [23594921](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23594921/)
11. Singh A, Jain A, Sarma BK, Upadhyay RS, Singh HB. Rhizosphere competent microbial consortium mediates rapid changes in phenolic profiles in chickpea during *Sclerotium rolfii* infection. *Microbiol Res*. Elsevier GmbH.; 2014; 169: 353–360. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.014> PMID: [24168925](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24168925/)
12. Barea JM, Toró M, Orozco MO, Campos E, Azcón R. The application of isotopic (³²P and ¹⁵N) dilution techniques to evaluate the interactive effect of phosphate-solubilizing rhizobacteria, mycorrhizal fungi and *Rhizobium* to improve the agronomic efficiency of rock phosphate for legume crops. *Nutr Cycl Agroecosystems*. 2002; 63: 35–42. <https://doi.org/10.1023/A:1020689732436>
13. Zoppellari F, Malus E, Chitarra W, Lovisolo C, Spanna F, Bardi L. Improvement of drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) by selected rhizospheric microorganisms. *Ital J Agrometeorol*. 2014;
14. Shahzad SM, Khalid A, Arif MS, Riaz M, Ashraf M, Iqbal Z, et al. Co-inoculation integrated with P-enriched compost improved nodulation and growth of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) under irrigated and rainfed farming systems. *Biol Fertil Soils*. 2014; 50: 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00374-013-0826-2>
15. Oliveira ALM, Stoffels M, Schmid M, Reis VM, Baktani JI, Hartmann A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. *Eur J Soil Biol*. Elsevier Masson SAS; 2009; 45: 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.09.004>
16. Albareda M, Rodríguez-Navarro DN, Camacho M, Temprano FJ. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations. *Soil Biol Biochem*. 2006; 40: 2771–2779. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.07.021>
17. Reina-Bueno M, Argandoña M, Nieto JJ, Hidalgo-García A, Iglesias-Guerra F, Delgado MJ, et al. Role of trehalose in heat and desiccation tolerance in the soil bacterium *Rhizobium* spp. *BMC Microbiol*. 2012; 12: 207. <https://doi.org/10.1186/1471-2185-12-207> PMID: [22985230](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22985230/)
18. Streeter JG. Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. *J Appl Microbiol*. 2003; 95: 484–491. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02017.x> PMID: [12911696](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12911696/)
19. Potts M. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev*. 1994; 58: 755–805. <https://doi.org/10.1093/mb/58.5.800> PMID: [7854254](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7854254/)
20. Vilchez S, Manzanera M. Biotechnological uses of desiccation-tolerant microorganisms for the rhizoremediation of soils subjected to seasonal drought. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011; 91: 1297–1304. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3461-6> PMID: [21769483](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21769483/)
21. Suárez RF, Morales LA, Gálvez A. Importance of Mexican maize landraces in the national diet. an Essential Review. *Rev Fitotec Mex*. 2013; 36: 275–283.
22. Lopez-Martinez LX, Oliart-Roa RM, Valerio-Allaro G, Lee CH, Parkin KL, Garcia HS. Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *LWT—Food Sci Technol*. Elsevier Ltd; 2009; 42: 1187–1192. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.10.010>
23. Camelo-Méndez GA, Agama-Acevedo E, Sánchez-Rivera MM, Bello-Pérez LA. Effect on in vitro starch digestibility of Mexican blue maize anthocyanins. *Food Chem*. 2016; 211: 281–284. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.024> PMID: [27283633](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27283633/)

24. Muñoz-Rojas J, Fuentes-Ramírez LE, Caballero-Mellado J. Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association. *FEMS Microbiol Ecol*. 2005; 54: 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.femsac.2005.02.011> PMID: 16329972
25. Summers MAM, Heitkamp MR, Cheng MS, Benjamin MAJ, Jr CK. PrePrints. 2012. 10.7287/peerj.preprints.35v1
26. Noel KD, Sanchez A, Fernandez L, Leemans J, Cevallos MA. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J Bacteriol*. 1984; 158: 148–155. PMID: 6325385
27. Segovia L, Young JP, Martínez-Romero E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1993; 43: 374–377. <https://doi.org/10.1099/00207713-43-2-374> PMID: 8494746
28. Muñoz-Rojas J, Bernal P, Duque E, Godoy P, Segura A, Ramos JL. Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72: 472–477. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.472-477.2006> PMID: 16391080
29. Corral-Lugo A, Morales-García YE, Pazos-Rojas LA, Ramírez-Valverde A, Débora Martínez-Contreras R, Muñoz-Rojas J. Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de "Goteo en Placa por Sallado (o estampado) Masivo. *Colomb Biotecnológica*. 2012; 14: 147–156. <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v14n2/v14n2a16.pdf>
30. Marín-Cevada V, Muñoz-Rojas J, Caballero-Mellado J, Mascarúa-Esparza MA, Castañeda-Lucio M, Carreño-López R, et al. Antagonistic interactions among bacteria inhabiting pineapple. *Appl Soil Ecol*. 2012; 61: 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.11.014>
31. Rodríguez Cáceres EA. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 1982, pp. 990–991. PMID: 16346123
32. Estrada-De Los Santos P, Bustillos-Cristales R, Caballero-Mellado J. *Burkholderia*, a Genus Rich in Plant-Associated Nitrogen Fixers with Wide Environmental and Geographic Distribution. *Appl Environ Microbiol*. 2001; 67: 2790–2798. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2790-2798.2001> PMID: 11375196
33. Pikovskaya RI. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*. 1948; 17: 362–370.
34. Gulati A, Vyas P, Rahi P, Kasana RC. Plant growth-promoting and rhizosphere-competent *Acinetobacter rhizosphaerae* strain BIHB 723 from the cold deserts of the himalayas. *Curr Microbiol*. 2009; 58: 371–377. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9339-x> PMID: 19137371
35. Carreño-López N R, Eimerich C, Baca BE. Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. *Mol Gen Genet*. 2000; 264: 521–530. <https://doi.org/10.1007/s004380000340> PMID: 11129057
36. Pérez-Miranda S, Cabirol N, George-Téllez R, Zamudio-Rivera LS, Fernández FJ. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J Microbiol Methods*. 2007; 70: 127–131. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.03.023> PMID: 17507108
37. Rodríguez-Andrade O, Fuentes-Ramírez LE, Morales-García YE, Molina-Romero D, Bustillos-Cristales MR, Martínez-Contreras RD, et al. The decrease in the population of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane after nitrogen fertilization is related to plant physiology in split root experiments. *Rev Argent Microbiol*. 2015; 47: 335–343. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.09.004> PMID: 26652262
38. Murashige T, Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant*. 1962; 15: 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3054.1962.tb08052.x>
39. Weisburg WG, Barns SM, Peletier DA, Lane DJ. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *J Bacteriol*. 1991; 173: 697–703. n.a. PMID: 1987160
40. Bogino P, Abod A, Nieves F, Giordano W. Water-limiting conditions alter the structure and biofilm-forming ability of bacterial multispecies communities in the alfalfa rhizosphere. *PLoS One*. 2013; 8: 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079614> PMID: 24223979
41. dos Santos CLR, Alves GC, de Matos Macedo AV, Giori FG, Pereira W, Urquiaga S, et al. Contribution of a mixed inoculant containing strains of *Burkholderia* spp. and *Herbaspirillum* ssp. to the growth of three sorghum genotypes under increased nitrogen fertilization levels. *Appl Soil Ecol*. 2017; 113: 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.02.008>
42. De Oliveira ALM, De Canuto EL, Urquiaga S, Reis VM, Baldani JI. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. *Plant Soil*. 2006; 284: 23–32. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-0025-0>
43. Imran A, Mirza MS, Shah TM, Malik KA, Hafeez FY. Differential response of kabuli and desi chickpea genotypes toward inoculation with PGPR in different soils. *Front Microbiol*. 2015; 6: 1–14.
44. Muñoz-Rojas J, Caballero-Mellado J. Population Dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in Sugarcane Cultivars and Its Effect on Plant Growth. *Microb Ecol*. 2003; 46: 454–464. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-0110-3> PMID: 14722690

45. Thakur R, Sharma KC, Gulati A, Sud RK, Gulati A. Stress-Tolerant *Viridibacillus arenosus* Strain IHB B 7171 from Tea Rhizosphere as a Potential Broad-Spectrum Microbial Inoculant. *Indian J Microbiol*. Springer India; 2017; 57: 195–200. <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0642-8> PMID: 28611497
46. Vilchez JI, García-Fontana C, Román-Naranjo D, González-López J, Manzanera M. Plant drought tolerance enhancement by trehalose production of desiccation-tolerant microorganisms. *Front Microbiol*. 2016; 7: 1–11.
47. Velázquez-Hernández ML, Baizabal-Aguirre VM, Cruz-Vázquez F, Trejo-Contreras MJ, Fuentes-Ramírez LE, Bravo-Patiño A, et al. *Gluconacetobacter diazotrophicus* levanucrase is involved in tolerance to NaCl, sucrose and desiccation, and in biofilm formation. *Arch Microbiol*. 2011; 193: 137–149. <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0651-z> PMID: 21103984
48. Cytryn EJ, Sangurdekar DP, Streeter JG, Franck WL, Chang WS, Stacey G, et al. Transcriptional and physiological responses of *Bradyrhizobium japonicum* to desiccation-induced stress. *J Bacteriol*. 2007; 189: 6751–6762. <https://doi.org/10.1128/JB.00533-07> PMID: 17660288
49. Donati AJ, Lee HI, Leveau JHJ, Chang WS. Effects of indole-3-Acetic Acid on the Transcriptional Activities and Stress Tolerance of *Bradyrhizobium japonicum*. *PLoS One*. 2013; 8: 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076559> PMID: 24088533
50. Casteriano A, Wilkes MA, Deaker R. Physiological changes in rhizobia after growth in peat extract may be related to improved desiccation tolerance. *Appl Environ Microbiol*. 2013; 79: 3998–4007. <https://doi.org/10.1128/AEM.00882-13> PMID: 23603686
51. Matilla MA, Ramos JL, Bakker PAHM, Doornbos R, Badri DV, Vivanco JM, et al. *Pseudomonas putida* KT2440 causes induced systemic resistance and changes in *Arabidopsis* root exudation. *Environ Microbiol Rep*. 2010; 2: 381–8. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00091.x> PMID: 23766110
52. Molina-Romero D, Morales-García YE, Hernández-Tenorio A-L, Castañeda-Lucio M, Netzahuatl-Muñoz AR, Muñoz-Rojas J. Crecimiento de maíz en función de la temperatura. *Rev Iberoam Ciencias*. 2017; 1–9.
53. Aasen IM, Moretto T, Katla T, Axelsson L, Storro I. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2000; 53: 159–166. <https://doi.org/10.1007/s002530050003> PMID: 10708977
54. Anacarso I, Bondi M, Mura C, Niederhäusern De S, Iseppi R, Mesi P, et al. Culture Compounds which are able to increase the growth and the production of bacteriocins by two different LABS. *Plant Pathol Microb*. 2014; 5. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000234>
55. Schreiter S, Sandmann M, Smalla K, Grosch R. Soil type dependent rhizosphere competence and bio-control of two bacterial inoculant strains and their effects on the rhizosphere microbial community of field-grown lettuce. *PLoS One*. 2014; 9: 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103726> PMID: 25099168
56. Bonito G, Reynolds H, Robeson MS, Nelson J, Hodgkinson BP, Tuskan G, et al. Plant host and soil origin influence fungal and bacterial assemblages in the roots of woody plants. *Mol Ecol*. 2014; 23: 3356–3370. <https://doi.org/10.1111/mec.12821> PMID: 24894495
57. Somers E, Ptacek D, Gysegom P, Srinivasan M, Vanderleyden J. *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. *Appl Environ Microbiol*. 2005; 71: 1803–1810. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1803-1810.2005> PMID: 15812004
58. Bachhawat AK, Ghosh S. Temperature inhibition of siderophore production in *Azospirillum brasilense*. *J Bacteriol*. 1989; 171: 4092–4094. PMID: 2525551
59. Rodríguez H, Gonzalez T, Goire I, Bashan Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften*. 2004; 91: 552–555. <https://doi.org/10.1007/s00114-004-0566-0> PMID: 15502903
60. Tapia-Hernández, Mascanía-Esparza MA C-M J. Production of bacteriocins and siderophore-like activity by *Azospirillum brasilense*. *Microbios*. 1990; 64: 73–83. PMID: 2148954
61. Saia S, Rappa V, Ruisi P, Abenavoli MR, Sunseri F, Giambalvo D, et al. Soil inoculation with symbiotic microorganisms promotes plant growth and nutrient transporter genes expression in durum wheat. *Front Plant Sci*. 2015; 6: 1–10.
62. Von Felten A, Défago G, Maurhofer M. Quantification of *Pseudomonas fluorescens* strains F113, CHAD and Pf153 in the rhizosphere of maize by strain-specific real-time PCR unaffected by the variability of DNA extraction efficiency. *J Microbiol Methods*. 2010; 81: 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.003> PMID: 20153383
63. Chauhan H, Bagyaraj DJ. Inoculation with selected microbial consortia not only enhances growth and yield of French bean but also reduces fertilizer application under field condition. *Sci Hortic (Amsterdam)*. Elsevier B.V.; 2015; 197: 441–446. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.10.001>

64. Gamalero E, Trotta A, Massa N, Copetta A, Martinotti MG, Berta G. Impact of two fluorescent pseudomonads and an arbuscular mycorrhizal fungus on tomato plant growth, root architecture and P acquisition. *Mycorrhiza*. 2004; 14: 185–192. <https://doi.org/10.1007/s00572-003-0256-3> PMID: 15197635
65. Gunasekera TS, Sørensen A, Attfield PV, Sørensen SJ, Veal DA. Inducible Gene Expression by Non-culturable Bacteria in Milk after Pasteurization. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 64: 1988–1993.
66. Panikov NS, Mandalakis M, Dai S, Mulcahy LR, Fowle W, Garrett WS, et al. Near-zero growth kinetics of *Pseudomonas putida* deduced from proteomic analysis. *Environ Microbiol*. 2015; 17: 215–228. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12584> PMID: 25088710
67. Baez-Rogelio A, Morales-García YE, Quintero-Hernández V, Muñoz-Rojas J. Next generation of microbial inoculants for agriculture and bioremediation. *Microb Biotechnol*. 2017; 10: 19–21. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12448> PMID: 27790851

Tabla S1. Cepas empleadas en este trabajo.

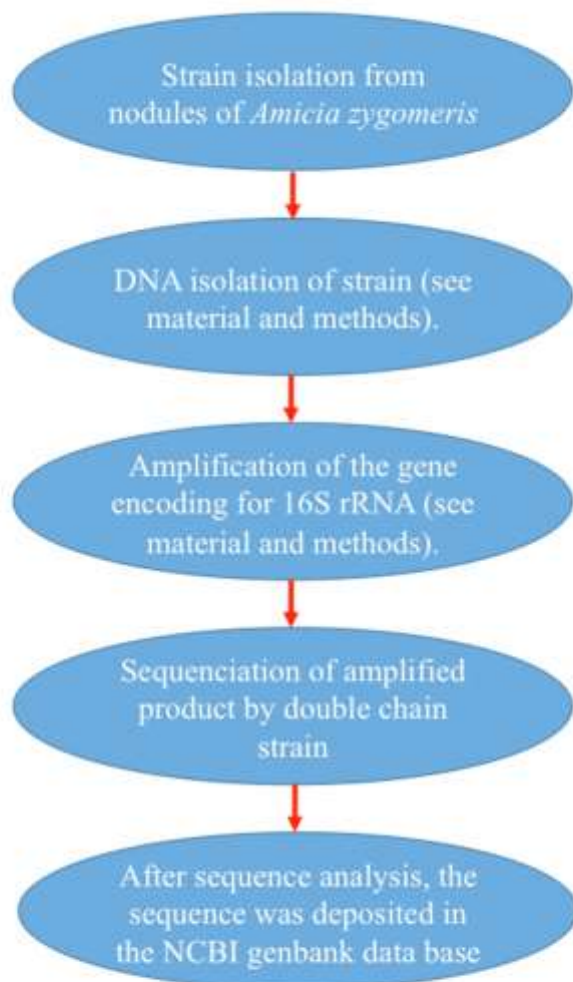
	Cepas	Fuente de aislamiento	Referencia
1	<i>Enterobacter</i> sp. UAPSO3001	Maíz	Morales-García <i>et al.</i> , 2011
2	<i>Paraburkholderia unamae</i> MT1-641 ^T	Maíz	Estrada-de los Santos <i>et al.</i> , 2001
3	<i>Paraburkholderia tropica</i> MTo-293	Maíz	Estrada-de los Santos <i>et al.</i> , 2001
4	<i>P. tropica</i> Pp8 ^T	Caña de azúcar	Reis <i>et al.</i> , 2004
5	<i>A. brasilense</i> Sp7	Rizósfera de pasto	Tarrand <i>et al.</i> , 1978
6	<i>A. lipoferum</i>	Rizósfera de pasto	Baldani and Dobereiner, 1980
7	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Suelo	Nakazawa, 2002
8	<i>P. putida</i> DOT-T1E	Aguas residuales	Ramos-González <i>et al.</i> , 2001
9	<i>Acinetobacter</i> sp. EMM02	<i>Amicia zygoensis</i>	Este trabajo Accession number KU686485 from NCBI. Fig. S1 and Fig. S2
10	<i>Sphingomonas</i> sp. OF-178A	Suelo	Böltner <i>et al.</i> , 2008
11	<i>Sphingomonas</i> sp. DS-201	Suelo	Donado por Boltner D. (Collection strains from Department of Environmental Protection, EEZ-CSIC)
12	<i>Sphingomonas</i> sp. GOF-202	Rizósfera de suelo de pasto	Donado por Boltner D. (Collection strains from Department of Environmental Protection, EEZ-CSIC)
13	<i>Sphingomonas</i> sp. GOF-203	Rizósfera de suelo de pasto	Böltner <i>et al.</i> , 2008
14	<i>Sphingomonas</i> sp. GOF-204B	suelo	Böltner <i>et al.</i> , 2008
15	<i>Sphingomonas</i> sp. Ans285	Rizósfera de suelo de <i>Plantago lanceolata</i>	Donado por Boltner D. (Collection strains from Department of Environmental Protection, EEZ-CSIC)
16	<i>Sphingomonas</i> sp. Ans290	Rizósfera de suelo de pasto <i>Plantago lanceolata</i>	Donado por Boltner D. (Collection strains from Department of Environmental Protection, EEZ-CSIC)
17	<i>Bradyrhizobium</i> sp. MS13	Nódulo de <i>Flemingia macrophylla</i>	Donado por Munive-Hernández A. (Colección de cepas Molecular Microbial Ecology Laboratory, CICM-ICUAP)
18	<i>Rhizobium</i> sp. MS24	Nódulo de <i>Phaseolus coccineus</i>	Donado por Munive-Hernández A. (Colección de cepas Molecular Microbial Ecology Laboratory, CICM-ICUAP)
19	<i>Bradyrhizobium</i> sp. MS21	Nódulo de <i>A. zygoensis</i>	Donado por Munive-Hernández A. (Colección de cepas Molecular Microbial Ecology Laboratory, CICM-ICUAP)
20	<i>Bradyrhizobium</i> sp. MS22	Nódulo de <i>Trifolium repens</i>	Donado por Munive-Hernández A. (Colección de cepas Molecular Microbial Ecology Laboratory, CICM-ICUAP)
21	<i>Bradyrhizobium</i> sp. MS23	Nódulo de <i>P. coccineus</i>	Donado por Munive-Hernández A. (Colección de cepas Molecular Microbial Ecology Laboratory, CICM-ICUAP)
22	<i>P. tropica</i> MTo-672	Maíz	Reis <i>et al.</i> , 2004
23	<i>P. tropica</i> MOc-725	Maíz	Estrada-de los Santos <i>et al.</i> , 2001
24	<i>P. tropica</i> MCo-761	Maíz	Reis <i>et al.</i> , 2004
25	<i>P. unamae</i> ScCu23	Caña de azúcar	Caballero-Mellado <i>et al.</i> , 2004

Tabla S2. Identidad de la secuencia del gen 16S rRNA de la cepa *Acinetobacter* sp. EMM02 (KU686485)

Cepa	% Identidad
<i>Acinetobacter</i> sp. EMM02 (KU686485)	100
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (AY277552)	99
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (FJ860876)	98
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (JQ781506)	99
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (JX133214)	99
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (KC247688)	99
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (KC758143)	99
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (KF762557)	98
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (KF923419)	99
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (KF704066)	99
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (KF704067)	99
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (KJ767372)	98
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (KJ939472)	98
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (KM114920)	99
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (KP762556)	98
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (KP762541)	98
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (KP762557)	98
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (KP762560)	98
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (KP762563)	98
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (KT369903)	99
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (KT369887)	99
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (KT634059)	99
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (KU350599)	99
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (LN995703)	98
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (NR 113343)	98
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (NR 117619)	98
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (NR119113)	98
<i>Acinetobacter rhizosphaerae</i> (AM921638)	98
<i>Acinetobacter rhizosphaerae</i> (DQ536511)	98

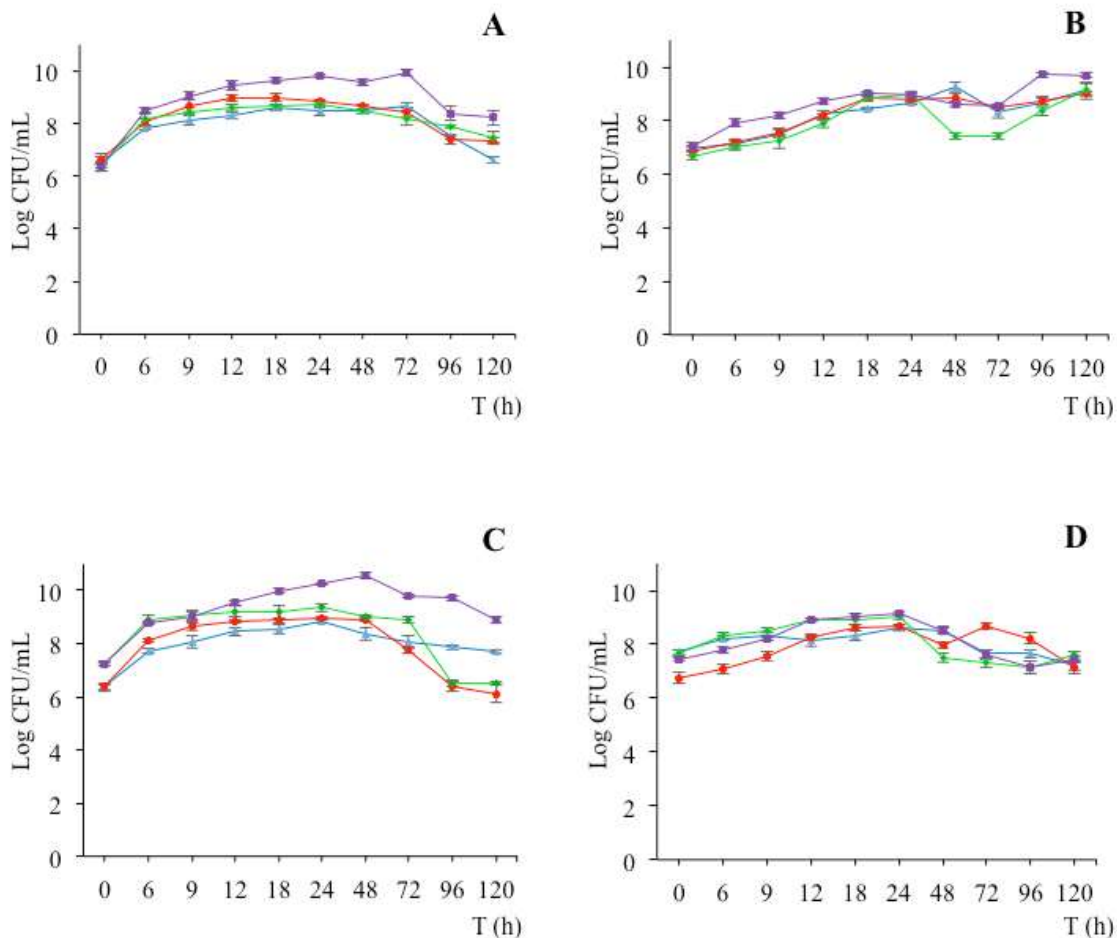
<i>Acinetobacter rhizosphaerae</i> (FN600413)	98
<i>Acinetobacter rhizosphaerae</i> (JQ435662)	98

S1. Diagrama de flujo de la identificación de *Acinetobacter* sp. EMM02.



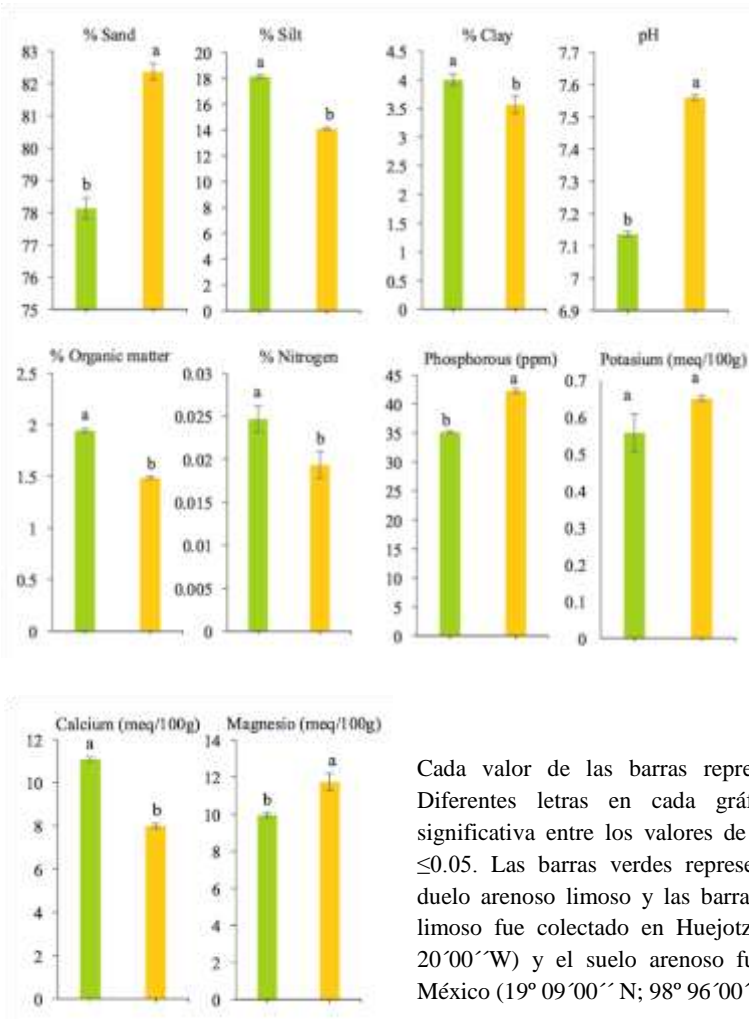
S1. Flow-chart to illustrate the identification of *Acinetobacter* sp. EMM02 by amplification and sequencing of the gene encoding for 16S rRNA.

Fig. S2. Compatibilidad de las cepas bacterianas seleccionadas para el inoculante multi-especies



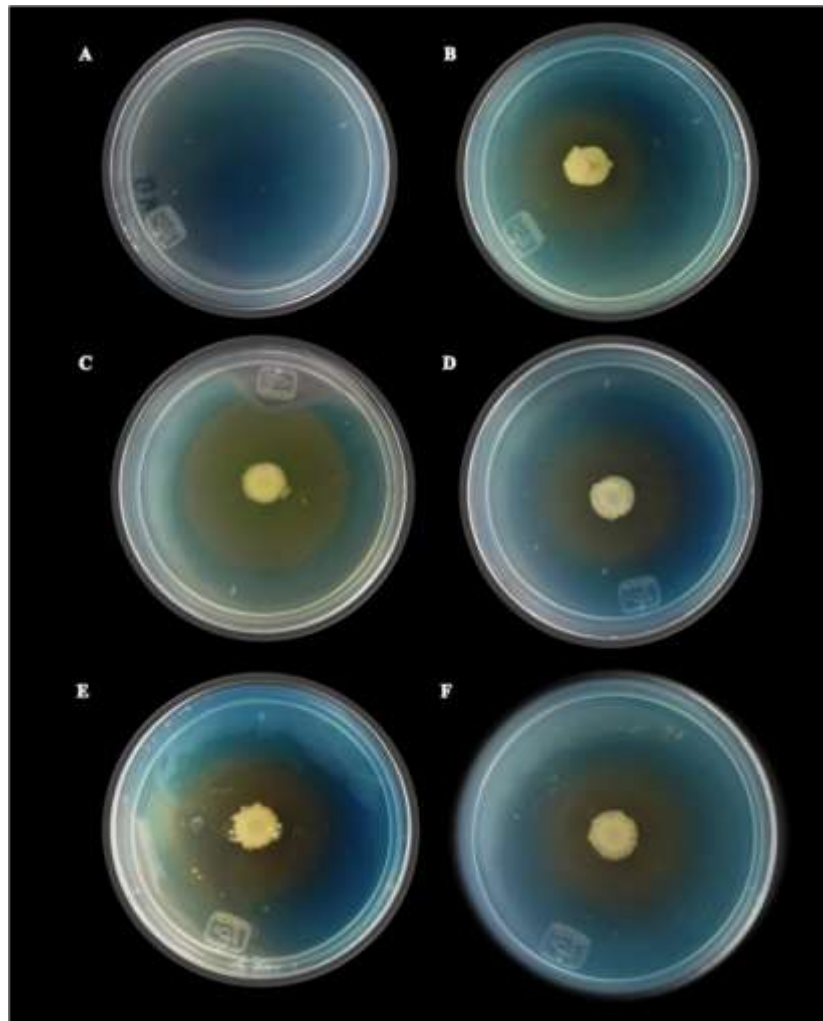
Crecimiento bacteriano individual y en consorcio en medio líquido SYP y PY-Ca. A) Crecimiento de las cuatro cepas de forma individual en medio líquido SYP. B) Crecimiento de las cuatro cepas en consorcio en medio líquido SYP. C) Crecimiento de las cuatro cepas de forma individual en medio líquido PY-Ca. D) Crecimiento de las cuatro cepas en consorcio en medio líquido PY-Ca. Línea morada significa el crecimiento de *Sphingomonas* sp. OF178, línea roja significa el crecimiento *P. putida* KT2440, línea verde significa el crecimiento de *Acinetobacter* sp. EMM02, y línea azul significa el crecimiento de *A. brasilense* Sp7. Cada punto representa la media de cinco determinaciones independientes y la respectiva desviación Estándar. El crecimiento de las cepas fue similar en forma individual y en consorcio.

Fig.S3 Análisis fisicoquímico de suelo arenoso y arenoso limoso usado como soporte para experimentos de desecación.



Cada valor de las barras representa la media de tres determinaciones. Diferentes letras en cada gráfica significa diferencia estadísticamente significativa entre los valores de las barras usando la prueba *t*-Student a $P \leq 0.05$. Las barras verdes representan las características fisicoquímicas del suelo arenoso limoso y las barras naranjas suelo arenoso. El suelo arenoso limoso fue colectado en Huejotzingo, Puebla México (19° 06'00'' N; 98° 20'00'' W) y el suelo arenoso fue colectado de Domingo Arenas, Puebla, México (19° 09'00'' N; 98° 96'00'' O).

Fig S4. Producción de sideróforos de las cepas del consorcio



A) Control B) *A. brasilense* Sp7, C) *P. putida* KT2440,
D) *Acinetobacter* sp. EMM02, E) *Sphingomonas* sp. OF178 y F) Consorcio.

Tabla S3 Población bacteriana en suspensiones bacterianas

	Medio selectivo	*Log UFC /ml suspensión de una cepa bacteriana	*Log UFC /ml suspensión de la mezcla bacteriana	**Log UFC /ml suspensión de una cepa bacteriana	**Log UFC /ml suspensión de la mezcla bacteriana
<i>A. brasilense</i> Sp7	Congo red Cro ⁵⁰	7.70 ±0.42	7.10 ±0.51	8.00 ±0.30	7.50 ±0.37
<i>P. putida</i> KT2440	MM9- citrate Cm ¹⁵⁰	5.90 ±0.36	5.10 ±0.38	5.70 ±0.32	5.00 ±0.31
<i>Acinetobacter</i> sp. EMM02	BAC CTX ³⁰	8.50 ±0.39	7.00 ±0.41	7.60 ±0.35	7.00 ±0.21
<i>Sphingomonas</i> sp. OF178	LB 5% AK ⁵⁰	8.80 ±0.42	8.30 ±0.24	8.73 ±0.27	8.10 ±0.31

Determinación del número de células en la suspensión bacteriana (Log de UFC/ml) cada valor es el promedio de cinco repeticiones independientes con su respectiva desviación estandar, realizado por el método de MSDP en medio selectivo para cada cepa. Cro=Ceftriaxona 50 µg /ml, Cm=cloranfenicol 150 µg /ml, CTX=cefotaxima 30 µg /ml, AK= amikacina 50 µg /ml. * Experimento con semillas inoculadas sin estrés (Exp 2). ** Experimento con semillas inoculadas y sujetas a estrés por desecación (Exp.3).

Tabla S4. Adhesión de las cepas a las semillas sembradas en vermiculita.

Tratamiento de inoculación	*Log UFC/semilla	** Log UFC /semilla
<i>A. brasilense</i> Sp7	5.71 ±0.41	4.63 ±0.46
Bacterial mixture Sp7	7.68 ±0.18	4.25 ±0.30
<i>P. putida</i> KT2440	7.50 ±0.14	0
Bacterial mixture KT2440	5.01 ±0.17	0
<i>Acinetobacter</i> sp. EMM02	7.87 ±0.20	7.19 ±0.21
Bacterial mixture EMM02	7.48 ±0.35	6.70 ±0.3
<i>Sphingomonas</i> sp. OF178	6.55 ±0.33	7.35 ±0.36
Bacterial mixture OF178	6.01 ±0.36	7.78 ±0.1

Determinación de la población bacteriana adherida a la superficie semilla (Log de UFC/ml) cada valor es el promedio de cinco repeticiones independientes con su respectiva desviación estandar, realizado por el método de MSDP en medio selectivo para cada cepa. * Experimento con semillas inoculadas sin estrés (Exp 2). ** Experimento con semillas inoculadas y sujetas a estrés por desecación durante 18 días antes de la germinación (Exp.3). Semillas no inoculadas no presentaron crecimiento bacteriano.

Tabla S5. Colonización de las rizósfera de plantas de maíz con las cepas de la mezcla bacteriana.

Tratamiento de inoculación	*15 DAS Log UFC/g V	*30 DAS Log UFC /g V	*45 DAS Log UFC /g V	**15 DAS Log UFC /g V	**30 DAS Log UFC /g V	**45 DAS Log UFC /g V
<i>A. brasilense</i> Sp7	6.10 ±0.16	7.20 ±0.45	8.60 ±0.38	7.90 ±0.28	8.40 ±0.56	8.20 ±0.56
Bacterial mixture Sp7	6.90 ±0.19	7.20 ±0.54	8.50 ±0.32	8.40 ±0.34	8.30 ±0.45	8.60 ±0.41
<i>P. putida</i> KT2440	6.40 ±0.2	5.69 ±0.39	6.60 ±0.62	6.40 ±0.2	6.11 ±0.69	6.50 ±0.4
Bacterial mixture KT2440	7.00 ±0.26	4.10 ±0.47	5.90 ±0.69	6.70 ±0.26	6.80 ±0.37	5.50 ±0.39
<i>Acinetobacter</i> sp. EMM02	6.70 ±0.14	6.50 ±0.34	7.60 ±0.25	5.60 ±0.22	6.10 ±0.36	7.60 ±0.31
Bacterial mixture EMM02	7.80 ±0.52	6.20 ±0.56	7.90 ±0.52	6.00 ±0.18	6.00 ±0.42	8.80 ±0.23
<i>Sphingomonas</i> sp. OF178	6.18 ±0.71	6.70 ±0.67	8.00 ±0.40	8.20 ±0.45	8.80 ±0.09	8.60 ±0.14
Bacterial mixture OF178	7.72 ±0.15	6.20 ±0.54	7.40 ±0.45	8.00 ±0.29	8.10 ±0.32	8.10 ±0.44

Cada valor representa el promedio de cinco repeticiones independientes con su respectiva desviación estandar. DAS: días después del sembrado. Bacterias con diferente morfología a la morfología de las cepas de referencia fueron aisladas de plantas control, con poblaciones menores a 10^3 UFC/g V, * Experimento con semillas inoculadas sin estrés (Exp 2). ** Experimento con semillas inoculadas y sujetas a estrés por desecación durante 18 días antes de la germinación (Exp.3).

DISCUSIÓN

La formulación y optimización de una mezcla bacteriana eficiente como multi-inoculante requiere estudios de co-interacción entre los miembros de la mezcla, la adhesión bacteriana a la semilla, la colonización de las raíces de las plantas así como la evaluación de la bacteria para la promoción del crecimiento de la planta (Sundaramoorthy *et al.* 2012; Singh *et al.* 2014; dos Santos *et al.* 2017). Sin embargo, algunos factores ambientales puedan afectar la eficiencia de un inoculante, como el tipo de suelo (De Oliveira *et al.* 2006; Egamberdiyeva 2007), variedad, fisiología de la planta (Bogino *et al.* 2013; Imran *et al.* 2015; J. Muñoz-Rojas and Caballero-Mellado 2003), salinidad (Egamberdieva *et al.* 2016; Ullah and Bano 2015), disponibilidad de agua (Bogino *et al.* 2013; Reina-Bueno *et al.* 2012) entre otras. En particular, la carencia de disponibilidad de agua impacta negativamente sobre la supervivencia de la bacteria en semillas inoculadas, una vez que ésta sido cultivada (Reina-Bueno *et al.* 2012).

La coexistencia bacteriana es fundamental para la formulación de una mezcla bacteriana estable (Oliveira *et al.* 2009). Las bacterias pueden co-existir aun cuando producen sustancias inhibitorias en contra de otros microorganismos, algunas cepas productoras de sustancias inhibitorias pueden co-existir con otras cepas resistentes a estas sustancias inhibitorias, estableciendo un cuasi-equilibrio en las poblaciones bacterianas (Riley 2009). En el presente trabajo encontramos 17 cepas pueden coexistir, sugiriendo que estas cepas cuentan con el potencial para formular un consorcio.

En este trabajo observamos que diferentes géneros bacterianos presentan diferentes niveles de resistencia a la desecación (30 °C, 50% HR), como lo registrado para las cepas *Paraburkholderia tropica* MTo-672, *P. tropica* MOc-725 y *P. unamae* ScCu23 que presentaron alta sensibilidad a la desecación (Tabla 2), este resultado es similar a lo documentado en otras PGPR, como ejemplo es el de *G. diazotrophicus* PAI 5 R que puede resistir 2 días a la desecación (Velázquez-Hernández *et al.* 2011). Mientras que *B. japonicum* puede resistir 3 días a este estrés (Velázquez-Hernández *et al.* 2011; Donati *et al.* 2013).

Algunas bacterias presentaron resistencia mediana a la desecación como las cepas *Sphingomonas* sp. GOF203 y *P. putida* KT2440, nuestros resultados concuerdan con la tolerancia media a la desecación reportado para *S. meliloti*, *R. etli*, (Reina-Bueno *et al.* 2012). Otro ejemplo de bacterias con tolerancia intermedia a la desecación es el de *R. leguminosarum* y *B. japonicum* que pueden incrementar su tolerancia a la desecación cuando presentan acumulación de trehalosa (Casteriano, Wilkes, and Deaker 2013; Humann *et al.* 2009).

También observamos otros géneros bacterianos que presentaron alta tolerancia a la desecación como: *Sphingomonas* sp. OF178, *Acinetobacter* sp. EMM02 y *A. brasilense* Sp7 (Tabla 2) (Molina-Romero, Baez, *et al.* 2017).

Por otra parte, se ha documentado que bacterias tolerantes a la desecación como *Microbacterium* sp. 3J1 and *Arthrobacter koreensis* 5J12A promueven el crecimiento vegetal del pepino, mostrando correlación entre el grado de tolerancia a la desecación y el nivel de protección a la desecación que le confieren a la planta con la que interactúa (Vílchez *et al.* 2016).

La formulación del consorcio bacteriano generado en este trabajo se sustentó en tres características: la capacidad de coexistir, resistencia a la desecación y potencial de promover el crecimiento vegetal. La mezcla bacteriana resultante de este trabajo (*A. brasilense* Sp7, *P. putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178, y *Acinetobacter* sp. EMM02) se produjo en base a los resultados de los experimentos de antagonismo bacteriano, resistencia a la desecación en diferentes sustratos, y capacidad de promover el crecimiento vegetal (Tablas 1, 2, 3) (Molina-Romero, Baez, *et al.* 2017), reportado en la literatura estas potencialidades, así como experimento durante este trabajo.

Para las cuatro cepas del consorcio se probó su compatibilidad en los medios PY-Ca y SYP bajo diferentes condiciones de cultivo, donde encontramos que *A. brasilense* Sp7, *P. putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178, y *Acinetobacter* sp. EMM02 crecen exitosamente en co-cultivo, corroborando su compatibilidad independientemente de las condiciones del medio de cultivo. Este experimento fue necesario realizar, debido a que se ha reportado que la composición del medio de cultivo, condiciones bióticas como abióticas puede afectar la producción de sustancias inhibitorias (Aasen *et al.* 2000; Anacarso *et al.* 2014; Riley and Wertz 2002).

Específicamente en el experimento 1 de promoción de crecimiento, donde se formuló un consorcio de cinco cepas capaces de co-existir, resistentes a la desecación, y con potencial PGPR, observamos que la interacción consorcio-planta bajo condiciones de crecimiento vegetal estresante por altas temperaturas, inhibió el crecimiento de las plantas de maíz en comparación a las plantas control y las plantas mono-inoculadas con la cepa *Enterobacter* sp. UAPSO300 (Gráfica E6 y E7). No siempre los consorcios trabajan sinérgicamente, algunos trabajos muestran que la co-interacción de dos cepas podría afectar el crecimiento de las plantas, por ejemplo, para las plantas de tomate inoculadas con el consorcio formulado con *Azospirillum brasilense* Sp245 y *Bacillus subtilis* 101, no mostró efecto sinérgico entre estas dos PGPR comparado con la mono-inoculación donde sí se observó promoción de crecimiento en tomate (Felici *et al.* 2008). Además, el consorcio bacteriano inhibió la raíz primaria de las plantas.

Por otra parte, en el grupo de trabajo de Ecología Molecular Microbiana también se han explorado la formulación de seis cepas bacterianas (*P. putida* KT2440, *Paraburkholderia unamae* MTL-641^T, *Sphingomonas* sp. OF178, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5, *Bradyrhizobium* sp MS02 y *Azospirillum brasilense* Sp7), los resultados obtenidos con este consorcio fue la promoción eficientemente del crecimiento vegetal en maíz rojo criollo,

pinto, amarillo, entre otras, así como otras plantas; sin embargo, este consorcio no promovió el crecimiento en maíz criollo azul y criollo banco (Morales-García *et al.* 2012).

Las bacterias *A. brasilense* Sp7, *Sphingomonas* sp. OF178, y *Acinetobacter* sp. EMM02 bajo condiciones óptimas de hidratación (Exp.2) y bajo condiciones de estrés por desecación (Exp. 3 y Fig 3), presenta una adecuada adhesión a la semilla y una eficiente colonización a las raíces de las plantas de maíz (Tabla S4 y S5), concordando nuestros resultados con lo reportado para algunas bacterias como *Burkholderia* sp., *B. megaterium* and *Sphingomonas* sp. con capacidad de colonizar la rizósfera de maíz después de cinco semanas de crecimiento de la planta (Saia *et al.* 2015).

Al evaluar el efecto de la inoculación del consorcio de este trabajo de tesis sobre la promoción del crecimiento vegetal del maíz azul, bajo condiciones de hidratación óptima (Exp 2), así como la mono-inoculación de las cepas *A. brasilense* Sp7, *P. putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178, y *Acinetobacter* sp. EMM02; los resultados mostraron que las plantas inoculadas con el consorcio bacteriano presentaron los valores más altos de los parámetros de crecimiento comparado a las plantas mono-inoculadas y las plantas control (Fig 2). Nuestros resultados están en acuerdo con lo reportado para caña de azúcar cuando es inoculada con el consorcio (*G. diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense*, and *P. tropica*) y reporta un incremento en la producción de tallo (De Oliveira *et al.* 2006), otro ejemplo es el estudiado en chícharo y trigo inoculado con un consorcio bacteriano que promueve el crecimiento vegetal de forma superior en comparación con plantas mono-inoculadas (Albareda *et al.* 2008; Singh *et al.* 2014).

En el experimento 3 de nuestro trabajo, las semillas inoculadas con el consorcio y las semillas mono-inoculadas fueron sometidas a un periodo de desecación de 18 días (Fig. 3), y posteriormente se sembraron en vermiculita, se observó que las plantas inoculadas con el consorcio presentan los parámetros de crecimiento más altos en comparación a las plantas mono-inoculadas y las plantas control (Fig.2). Estos resultados sugieren que las cuatro cepas del consorcio mantienen su capacidad de promover el crecimiento vegetal de las plantas de maíz azul criollo en consorcio, aun experimentando estrés por desecación.

La cepa *P. putida* KT2440 al experimentar estrés por desecación no fue detectada a los 12 días iniciado el proceso de desecación cuando estaba inoculada en las semillas en forma individual y en consorcio (Fig. 3).

Posterior a la desecación, las semillas fueron sembradas y se evaluó la adhesión de *P. putida* KT2440 a la semilla, de forma similar no se pudo recuperar a la bacteria en forma viable. Se evaluó la colonización a los 15, 30 y 45 dpi, en los tres estadios de crecimiento de la planta encontrando a la bacteria en órdenes de 10^6 CFU/g V. Estos resultados sugieren que esta bacteria entra a un estado viable pero no cultivable (VBNC) durante el proceso de estrés por desecación, y la bacteria retorna a un estado cultivable, cuando detecta

condiciones que ocurren en la rizósfera de la planta de maíz, además de mantener sus características PGPR. Ha sido reportado que durante el proceso de pasteurización *P. putida* KT2440 entra a un estado VBNC y se sugiere que la bacteria puede regresar a un estado cultivable cuando las condiciones ambientales no causan estrés al microorganismo, permitiendo su actividad metabólica a un nivel óptimo (Gunasekera *et al.* 2002). Posiblemente durante la desecación la bacteria entra a este estado como estrategia de supervivencia y activa sus actividades metabólicas una vez que las condiciones dejan de ser adversas (Pazos-Rojas *et al.* 2016; Panikov *et al.* 2015).

Por otra parte se ha documentado que bacterias tolerantes a la desecación como *Pseudomonas* spp. y *Viridibacillus arenosi* IHBB7171 son capaces de promover el crecimiento de las plantas como maíz, té, chícharo y trigo bajo condiciones adversas (Thakur *et al.* 2017). Nuestros resultados concuerdan con el trabajo mencionado anteriormente, donde observamos promoción de crecimiento en las plantas cuando son inoculadas con el consorcio bacteriano formulado (*A. brasilense* Sp7, *P.putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178, y *Acinetobacter* sp. EMM02) en este trabajo de tesis, bajo condiciones óptimas y condiciones de estrés por desecación (Fig. 2) (Molina-Romero, Baez, *et al.* 2017).

CONCLUSIONES

1. Se identificaron 17 cepas pertenecientes a los géneros *Azospirillum*, *Acinetobacter*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Paraburkholderia*, *Pseudomonas*, y *Sphingomonas*, que pueden coexistir sin establecer relaciones antagónicas.
2. Se evidenció que 12 cepas pertenecientes a los géneros anteriores, algunas de estas presentan alta, mediana y baja resistencia a la desecación, y 3 presentaron sensibilidad a la desecación.
3. La formulación de un consorcio bacteriano con cinco cepas (*A. brasilense* Sp7, *P. putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178, y *Acinetobacter* sp. EMM02 y *Enterobacter* sp. UAPSO3001) promueve el crecimiento de maíz azul cuando la planta crece a temperaturas óptimas; sin embargo, cuando la planta experimenta estrés por temperatura, el consorcio no ejerce promoción del crecimiento del maíz.
4. Se observó que la inoculación de maíz criollo azul con *P. putida* KT2440 promovió el crecimiento de este cereal, independientemente de la temperatura de crecimiento de la planta (30 y 45 °C).
5. La promoción de crecimiento más eficiente de *P. putida* KT2440 se observó cuando la planta crece a temperaturas estresantes.
6. El efecto de la promoción de crecimiento vegetal de las cepas *Acinetobacter* sp. EMM02 y *Enterobacter* sp. UAPSO3001 se ve afectado cuando el maíz es sometido a estrés por temperatura.
7. Se generó la formulación de un inoculante multi-especies (*A. brasilense* Sp7, *P. putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178, y *Acinetobacter* sp. EMM02) que contiene bacterias que co-existen, son resistentes a la desecación y promueven el crecimiento vegetal del maíz criollo azul.
8. Este consorcio bacteriano promueve el crecimiento vegetal del maíz de forma superior en comparación a la promoción que ejerce la mono-inoculación de las cuatro cepas al maíz azul criollo bajo condiciones hidratadas y de invernadero.
9. El consorcio bacteriano mantiene su capacidad de promover el crecimiento del maíz, aun experimentando estrés por desecación.

PERSPECTIVAS

1. Es necesario elucidar los mecanismos responsables de la promoción del crecimiento vegetal, cuando las bacterias del consorcio interactúan con la planta de maíz azul criollo.
2. Es importante evidenciar cuáles genes de *P. putida* KT2440 son expresados para la promoción del maíz cuando la planta experimenta estrés por temperatura.
3. El consorcio bacteriano presenta características adecuadas para su aplicación futura en el campo; requiriendo corroborar la inocuidad de estas bacterias bajo condiciones de campo.
4. Será necesario probar si este consorcio puede promover el crecimiento vegetal de otras variedades de maíz e incluso otros modelos vegetales, contribuyendo a las prácticas agrícolas sustentables.
5. Otra pregunta a contestar es, si la promoción de crecimiento del consorcio formulado con las cuatro PGPR (*A. brasilense* Sp7, *P. putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178, y *Acinetobacter* sp. EMM02) se ve afectado cuando la planta se enfrenta a estrés por déficit de agua, altas temperaturas, presencia de metales pesados o alta concentración salina.

BIBLIOGRAFIA

- Aasen, I M, T Møretrø, T Katla, L Axelsson, and I Storrø. 2000. "Influence of Complex Nutrients, Temperature and pH on Bacteriocin Production by *Lactobacillus Sakei* CCUG 42687." *Applied Microbiology and Biotechnology* 53 (2): 159–66. doi:10.1007/s002530050003.
- Adjanohoum, A, M Allagbe, P Noumavo, H Gotoechan-Hodonu, Dossa K, and Kotchoni S O. 2011. "Effects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Field Grown Maize." *Journal of Animal & Plant Sciences* 11 (3): 1457–65.
- Agama-Acevedo, Edith, Yolanda Salinas-Moreno, Glenda Pacheco-Vargas, and Luis Arturo Bello-Pérez. 2011. "Características Físicas Y Químicas de Dos Razas de Maíz Azul: Morfología Del Almidón* Physical and Chemical Characteristics of Blue Corn from Two Races: Starch Morphology." *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2 (3): 317–29.
- Aguado-Santacruz, Gerardo A., Blanca Moreno-Gómez, Betzaida Jiménez-Francisco, Edmundo García-Moya, and Ricardo E. Preciado-Ortiz. 2012. "Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos En La Asimilación de Hierro Por Las Plantas: Una Síntesis." *Revista Fitotecnia Mexicana* 35 (1): 9–21.
- Alami, Younes, Wafa Achouak, Christine Marol, and Thierry Heulin. 2000. "Rhizosphere soil aggregation and Plant Growth Promotion of sunflowers by an Exopolysaccharide-Producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots." *Applied and Environmental Microbiology* 66 (8): 3393–98.
- Alatorre-Cruz & Muñoz-Rojas. 2013. "Diseño de Inoculante Multiespecies Para Cactus Con Bacterias Resistentes a La Desección." Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Albareda, Marta, Dulce N. Rodríguez-Navarro, María Camacho, and Francisco J. Temprano. 2008. "Alternatives to Peat as a Carrier for Rhizobia Inoculants: Solid and Liquid Formulations." *Soil Biology and Biochemistry* 40 (11): 2771–79. doi:10.1016/j.soilbio.2008.07.021.
- Anacarso, Immacolata, Moreno Bondi, Cinzia Mura, Simona De Niederhäusern, Ramona Iseppi, Patrizia Messi, and Carla Sabia. 2014. "Plant Pathology & Microbiology Culture Compounds Which Are Able to Increase the Growth and the Production of Bacteriocins by Two Different LABS." *Plant Pathol Microb* 5 (3). doi:10.4172/2157-7471.1000234.
- Ansary, Mohammad Hossein, Hadi Asadi Rahmani, Mohammad Reza Ardakani, Farzad Paknejad, Davood Habibi, and Saeed Mafakheri. 2012. "Effect of *Pseudomonas fluorescent* on Proline and Phytohormonal Status of Maize (*Zea mays* L.) under Water Deficit Stress." *Annal Biol Res* 3 (2): 1054–62.
- Atieno, Mary, Laetitia Herrmann, Robert Okalebo, and Didier Lesueur. 2012. "Efficiency of Different Formulations of *Bradyrhizobium japonicum* and Effect of Co-Inoculation

- of *Bacillus subtilis* with Two Different Strains of *Bradyrhizobium japonicum*.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28 (7): 2541–50. doi:10.1007/s11274-012-1062-x.
- Babalola, Olubukola Oluranti. 2010. “Beneficial Bacteria of Agricultural Importance.” *Biotechnology Letters* 32 (11): 1559–70. doi:10.1007/s10529-010-0347-0.
- Baez-Rogelio, Antonino, Yolanda Elizabeth Morales-García, Verónica Quintero-Hernández, and Jesús Muñoz-Rojas. 2017. “Next Generation of Microbial Inoculants for Agriculture and Bioremediation.” *Microbial Biotechnology* 10 (1): 19–21. doi:10.1111/1751-7915.12448.
- Bano, Qudsia, Noshin Ilyas, Asghari Bano, Nadia Zafar, Abida Akram, and Fayaz U L Hassan. 2013. “Effect of *Azospirillum* Inoculation on Maize (*Zea mays* L.) under Drought Stress.” *Pakistan Journal of Botany* 45 (SPL.ISS): 13–20.
- Barea, J. M., M. Toro, M. O. Orozco, E. Campos, and R. Azcón. 2002. “The Application of Isotopic (³²P and ¹⁵N) Dilution Techniques to Evaluate the Interactive Effect of Phosphate-Solubilizing *Rhizobacteria*, *Mycorrhizal* Fungi and *Rhizobium* to Improve the Agronomic Efficiency of Rock Phosphate for Legume Crops.” *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 63 (1): 35–42. doi:10.1023/A:1020589732436.
- Beneduzi, Anelise, Adriana Ambrosini, and Luciane M P Passaglia. 2012. “Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): Their Potential as Antagonists and Biocontrol Agents” 4: 1044–51.
- Bogino, Pablo, Ayelén Abod, Fiorela Nievas, and Walter Giordano. 2013. “Water-Limiting Conditions Alter the Structure and Biofilm-Forming Ability of Bacterial Multispecies Communities in the Alfalfa Rhizosphere.” *PLoS ONE* 8 (11): 1–17. doi:10.1371/journal.pone.0079614.
- Camelo-Méndez, Gustavo a., Edith Agama-Acevedo, Mirna M. Sanchez-Rivera, and Luis a. Bello-Pérez. 2016. “Effect on in Vitro Starch Digestibility of Mexican Blue Maize Anthocyanins.” *Food Chemistry* 211: 281–84. doi:10.1016/j.foodchem.2016.05.024.
- Carreño-Lopez et al. 2000. “Physiological Evidence for Differently Regulated Tryptophan-Dependent Pathways for Indole-3-Acetic Acid Synthesis in *Azospirillum brasilense*.” *Molecular and General Genetics MGG* 264 (4): 521–30. doi:10.1007/s004380000340.
- Cassán, Fabricio, Diego Perrig, Verónica Sgroy, Oscar Masciarelli, Claudio Penna, and Virginia 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 (1): 28–35. doi:10.1016/j.ejsobi.2008.08.005.
- Castañeda-Sanchez, A. 2011. “Propiedades Nutricionales Y Antioxidantes Del Maíz Azul (*Zea Mays* L.)” *Temas Slectos de Ingeniería de Alimentos*.
- Casteriano, Andrea, Meredith a. Wilkes, and Rosalind Deaker. 2013. “Physiological Changes in Rhizobia after Growth in Peat Extract May Be Related to Improved

- Desiccation Tolerance.” *Applied and Environmental Microbiology* 79 (13): 3998–4007. doi:10.1128/AEM.00082-13.
- Chauhan, Hemlata, D.J. Bagyaraj, G. Selvakumar, and S.P. Sundaram. 2015. “Novel Plant Growth Promoting rhizobacteria—Prospects and Potential.” *Applied Soil Ecology* 95 (November): 38–53. doi:10.1016/j.apsoil.2015.05.011.
- Corral-Lugo, Andrés, Yolanda Elizabeth Morales-García, Laura Abisaí Pazos-Rojas, Araceli Ramírez-Valverde, Rebeca Débora Martínez-Contreras, and Jesús Muñoz-Rojas. 2012. “Cuantificación de Bacterias Cultivables Mediante El Método de Goteo en Placa Por Sellado (O Estampado) Masivo.” *Colombia Biotecnológica* 14 (2): 147–56.
- Czaran, T, R F Hoekstra, and Pagie L. 2002. “Chemical Warfare between Microbes.” *Pnas* 99: 786–90.
- De Oliveira, a. L M, Erineudo Lima De Canuto, Segundo Urquiaga, Veronica Massena Reis, and José Ivo Baldani. 2006. “Yield of Micropropagated Sugarcane Varieties in Different Soil Types Following Inoculation with Diazotrophic Bacteria.” *Plant and Soil* 284 (1–2): 23–32. doi:10.1007/s11104-006-0025-0.
- do Carmo, Flávia Lima, Henrique Fragoso dos Santos, Edir Ferreira Martins, Jan Dirk van Elsas, Alexandre Soares Rosado, and Raquel Silva Peixoto. 2011. “Bacterial Structure and Characterization of Plant Growth Promoting and Oil Degrading Bacteria from the Rhizospheres of Mangrove Plants.” *Journal of Microbiology* 49 (4): 535–43. doi:10.1007/s12275-011-0528-0.
- Donati, Andrew J., Hae In Lee, Johan H J Leveau, and Woo Suk Chang. 2013. “Effects of Indole-3-Acetic Acid on the Transcriptional Activities and Stress Tolerance of *Bradyrhizobium japonicum*.” *PLoS ONE* 8 (10): 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0076559.
- dos Santos, Carlos Leandro Rodrigues, Gabriela Cavalcanti Alves, Aline Vieira de Matos Macedo, Fabrício Garcia Giori, Willian Pereira, Segundo Urquiaga, and Veronica Massena Reis. 2017. “Contribution of a Mixed Inoculant Containing Strains of *Burkholderia* spp. and *Herbaspirillum* ssp. to the Growth of Three Sorghum Genotypes under Increased Nitrogen Fertilization Levels.” *Applied Soil Ecology* 113: 96–106. doi:10.1016/j.apsoil.2017.02.008.
- Dowswell et al. 1996. *Maize in the Third World*. Edited by Inc. Westview Press. Colorado, U.S.A.
- Egamberdieva, Dilfuza, Li Li, Kristina Lindström, and Leena A. Räsänen. 2016. “A Synergistic Interaction between Salt-Tolerant *Pseudomonas* and *Mesorhizobium* Strains Improves Growth and Symbiotic Performance of Liquorice (*Glycyrrhiza Uralensis* Fish.) under Salt Stress.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (6): 2829–41. doi:10.1007/s00253-015-7147-3.
- Egamberdiyeva, Dilfuza. 2007. “The Effect of Plant Growth Promoting Bacteria on Growth

- and Nutrient Uptake of Maize in Two Different Soils.” *Applied Soil Ecology* 36 (2–3): 184–89. doi:10.1016/j.apsoil.2007.02.005.
- Ehteshami et al. 2007. “Effect of Phosphate Solubilizing Microorganisms on Quantitative and Qualitative Characteristics of Maize (*Zea Mays* L.) under Water Deficits Stress.” *Pakistan Journal of Biological Sciences* 20 (10): 3585–91.
- Fasciglione, Gabriela, Elda M. Casanovas, Alejandra Yommi, Rolando J. Sueldo, and Carlos A. Barassi. 2012. “*Azospirillum* Improves Lettuce Growth and Transplant under Saline Conditions.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92 (12): 2518–23. doi:10.1002/jsfa.5661.
- Felici, Cristiana, Lorenzo Vettori, Enrico Giraldi, Laura Maria Costantina Forino, Annita Toffanin, Anna Maria Tagliasacchi, and Marco 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 (2): 260–70. doi:10.1016/j.apsoil.2008.05.002.
- Fibach-Paldi, Sharon, Saul Burdman, and Yaacov Okon. 2012. “Key Physiological Properties Contributing to Rhizosphere Adaptation and Plant Growth Promotion Abilities of *Azospirillum brasilense*.” *FEMS Microbiology Letters* 326 (2): 99–108. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02407.x.
- Fuentes Ramirez, Luis E, and Jesus Caballero Mellado. 2005. “Chapter 5 BACTERIAL BIOFERTILIZERS.” *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, no. 1622: 143–72.
- Gulati, Arvind, Pratibha Vyas, Praveen Rahi, and Ramesh Chand Kasana. 2009. “Plant Growth-Promoting and Rhizosphere-Competent *Acinetobacter rhizosphaerae* Strain BIHB 723 from the Cold Deserts of the Himalayas.” *Current Microbiology* 58 (4): 371–77. doi:10.1007/s00284-008-9339-x.
- Gunasekera, Thusitha S, Anders Sørensen, Paul V Atfield, Søren J Sørensen, and Duncan a Veal. 2002. “Inducible Gene Expression by Nonculturable Bacteria in Milk after Pasteurization Inducible Gene Expression by Nonculturable Bacteria in Milk after Pasteurization.” *Applied and Environmental Microbiology* 64 (4): 1988–93. doi:10.1128/AEM.68.4.1988.
- Guzmán, Andrés, Melissa Obando, Diego Rivera, and Ruth Bonilla. 2012. “Selección Y Caracterización de Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (RPCV) Asociadas Al Cultivo de Algodón (*Gossypium Hirsutum*).” *Revista Colombiana de Biotecnología* 14 (1): 182–90.
- Hassan, Waseem, Rizwana Bano, Farhat Bashir, and Julie David. 2014. “Comparative Effectiveness of ACC-Deaminase And/or Nitrogen-Fixing Rhizobacteria in Promotion of Maize (*Zea Mays* L.) Growth under Lead Pollution.” *Environmental Science and Pollution Research* 21 (18): 10983–96. doi:10.1007/s11356-014-3083-5.
- Hibbing, Michael E, Clay Fuqua, Matthew R Parsek, and S Brook Peterson. 2010. “Bacterial Competition: Surviving and Thriving in the Microbial Jungle.” *National*

Review of Microbiology 8 (1): 15–25. doi:10.1038/nrmicro2259.Bacterial.

- Hodge, Angela, David Robinson, and Alastair Fitter. 2000. “Are Microorganisms More Effective than Plants at Competing for Nitrogen?” *Trends in Plant Science* 5 (7): 304–8. doi:10.1016/S1360-1385(00)01656-3.
- Humann, Jodi L., Hope T. Ziemkiewicz, Svetlana N. Yurgel, and Michael L. Kahn. 2009. “Regulatory and DNA Repair Genes Contribute to the Desiccation Resistance of *Sinorhizobium meliloti* Rm1021.” *Applied and Environmental Microbiology* 75 (2): 446–53. doi:10.1128/AEM.02207-08.
- Imran, Asma, Muhammad S. Mirza, Tariq M. Shah, Kauser A. Malik, and Fauzia Y. Hafeez. 2015. “Differential Response of Kabuli and Desi Chickpea Genotypes toward Inoculation with PGPR in Different Soils.” *Frontiers in Microbiology* 6 (AUG): 1–14. doi:10.3389/fmicb.2015.00859.
- Inostroza, N. G., P. J. Barra, L. Y. Wick, M. L. Mora, and M. A. Jorquera. 2017. “Effect of Rhizobacterial Consortia from Undisturbed Arid- and Agro-Ecosystems on Wheat Growth under Different Conditions.” *Letters in Applied Microbiology* 64 (2): 158–63. doi:10.1111/lam.12697.
- Kang, Sang Mo, Ramalingam Radhakrishnan, Abdul Latif Khan, Min Ji Kim, Jae Man Park, Bo Ra Kim, Dong Hyun Shin, and In Jung Lee. 2014. “Gibberellin Secreting Rhizobacterium, *Pseudomonas putida* H-2-3 Modulates the hormonal and stress physiology of soybean to improve the Plant Growth under saline and drought Conditions.” *Plant Physiology and Biochemistry* 84 (December 2014). Elsevier Masson SAS: 115–24. doi:10.1016/j.plaphy.2014.09.001.
- Kuan, Khing Boon, Radziah Othman, Khairuddin Abdul Rahim, and Zulkifli H. Shamsuddin. 2016. “Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Inoculation to Enhance Vegetative Growth, Nitrogen Fixation and Nitrogen Remobilisation of Maize under Greenhouse Conditions.” *PLoS ONE* 11 (3): 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0152478.
- Kumar, Manoj, Sankalp Mishra, Vijaykant Dixit, Manoj Kumar, Lalit Agarwal, Puneet Singh Chauhan, and Chandra Shekhar Nautiyal. 2016. “Synergistic Effect of *Pseudomonas Putida* and *Bacillus Amyloliquefaciens* Ameliorates Drought Stress in Chickpea (*Cicer Arietinum* L.)” *Plant Signaling & Behavior* 11 (1): e1071004. doi:10.1080/15592324.2015.1071004.
- Leslie, S. B., E. Israeli, B. Lighthart, J. H. Crowe, and L. M. Crowe. 1995. “Trehalose and Sucrose Protect Both Membranes and Proteins in Intact Bacteria during Drying.” *Applied and Environmental Microbiology* 61 (10): 3592–97.
- Lopez-Martinez, Leticia X., Rosa M. Oliart-Ros, Gerardo Valerio-Alfaro, Chen Hsien Lee, Kirk L. Parkin, and Hugo S. Garcia. 2009. “Antioxidant Activity, Phenolic Compounds and Anthocyanins Content of Eighteen Strains of Mexican Maize.” *LWT - Food Science and Technology* 42 (6). Elsevier Ltd: 1187–92. doi:10.1016/j.lwt.2008.10.010.

- Lu, Dalei, Xuli Sun, Fabao Yan, Xin Wang, Renchao Xu, and Weiping Lu. 2013. "Effects of High Temperature during Grain Filling under Control Conditions on the Physicochemical Properties of Waxy Maize Flour." *Carbohydrate Polymers* 98 (1). Elsevier Ltd.: 302–10. doi:10.1016/j.carbpol.2013.06.005.
- Lugtenberg, Ben, and Faina Kamilova. 2009. "Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria." *Annual Review of Microbiology* 63 (1): 541–56. doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162918.
- Malik, Deepak K., and Satyavir S. Sindhu. 2011. "Production of Indole Acetic Acid by *Pseudomonas* Sp.: Effect of Coinoculation with *Mesorhizobium* sp. *Cicer* on Nodulation and Plant Growth of Chickpea (*Cicer arietinum*)." *Physiology and Molecular Biology of Plants* 17 (1): 25–32. doi:10.1007/s12298-010-0041-7.
- Marín-Cevada, V., J. Muñoz-Rojas, J. Caballero-Mellado, M. A. Mascarúa-Esparza, M. Castañeda-Lucio, R. Carreño-López, P. Estrada-de los Santos, and L. E. Fuentes-Ramírez. 2012. "Antagonistic Interactions among Bacteria Inhabiting Pineapple." *Applied Soil Ecology* 61 (October): 230–35. doi:10.1016/j.apsoil.2011.11.014.
- Molina-Favero, Celeste, Cecilia Mónica Creus, Marcela Simontacchi, Susana Puntarulo, and Lorenzo Lamattina. 2008. "Aerobic Nitric Oxide Production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and Its Influence on Root Architecture in Tomato." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21 (7): 1001–9. doi:10.1094/MPMI-21-7-1001.
- Molina-Romero, Dalia, Antonino Baez, Verónica Quintero-Hernández, Miguel Castañeda-Lucio, Luis Ernesto Fuentes-Ramírez, María del Rocío Bustillos-Cristales, Osvaldo Rodríguez-Andrade, Yolanda Elizabeth Morales-García, Antonio Munive, and Jesús Muñoz-Rojas. 2017. "Compatible Bacterial Mixture, Tolerant to Desiccation, Improves Maize Plant Growth." *Plos One* 12 (11): e0187913. doi:10.1371/journal.pone.0187913.
- Molina-Romero, Dalia, María del Rocío Bustillos-Cristales, Osvaldo Rodríguez-Andrade, Yolanda Elizabeth Morales-García, Yair Santiago-Saenz, Miguel Castañeda-Lucio, and Jesús Muñoz-Rojas. 2015. "Mecanismos de Fitoestimulación Por Rizobacterias , Aislamientos En América Y Potencial Biotecnológico." *Biológicas* 17 (2): 24–34.
- Molina-Romero, Dalia, Yolanda Elizabeth Morales-García, Ana-Laura Hernández-Tenorio, Miguel Castañeda-Lucio, Alma Rosa Netzahuatl-Muñoz, and Jesús Muñoz-Rojas. 2017. "Crecimiento de Maíz En Función de La Temperatura." *Revista Iberoamericana de Ciencias*, no. February: 1–9.
- Morales-García, P. van Dillewijnc, A. L. Hernández-Tenoriob, D. Molina-Romeroa, b, M. D. Castañeda-Antonioa y J. Muñoz-Rojasa. 2013. "EFECTIVIDAD DE UN INOCULANTE DE SEGUNDA GENERACIÓN PARA DEGRADAR UN TÓXICO COMO EL TRINITROLUENO (TNT)." *X Encuentro Participación de La Mujer En La Ciencia*.
- Morales-García, Y.E., D. Juárez-Hernández, C. Aragón-Hernández, M. A. Mascarua-Esparza, M. R. Bustillos-Cristales, L. E. Fuentes-Ramírez, R. D. Martínez-Contreras,

- and J. Muñoz-Rojas. 2011. "Growth Response of Maize Plantlets Inoculated with *Enterobacter* Spp., as a Model for Alternative Agriculture." *Revista Argentina de Microbiología* 43: 287–93. doi:10.1590/S0325-75412011000400009.
- Morales-García, Yolanda Elizabeth, Dalia Juárez-Hernández, Luis Ernesto Fuentes-Ramírez, and Jesús Munive-Hernández, Antonio Muñoz-Rojas. 2016. "Formulación De Un Inoculante Multiespecies Para Potenciar El Crecimiento De Plantas," no. April: 2013.
- Morales-García et al. 2011. "Growth Response of Maize Plantlets Inoculated with *Enterobacter* Spp., as a Model for Alternative Agriculture." *Revista Argentina de Microbiología* 43: 287–93. doi:10.1590/S0325-75412011000400009.
- Morales-García Yolanda Elizabeth, Muñoz-Galindo Leonardo, Hernández-Tenorio Ana Laura , Juárez-Hernández Dalia, Muñoz-García Andrés , Alatorre-Cruz Julia María , Molina-Romero Dalia, y Muñoz-Rojas Jesús. 2012. "Estimulación Del Crecimiento de Maíz Cultivado En Campo Mediante La Inoculación Con Un Inoculante Multiespecies." *Memoria IX Encuentro, Participación de La Mujer En La Ciencia. León Guanajuato, México.*, 1–4.
- Morales García Yolanda Elizabeth, Rodríguez Andrade Osvaldo, Hernández, Castañeda Antonio María Dolores Tenorio Ana Laura, Juárez Hernández Dalia, and Molina Romero Dalia y Muñoz Rojas Jesús. 2014. "CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS CONTENIDAS EN UN INOCULANTE MULTIESPECIES." *XI Encuentro. Participación de La Mujer En La Ciencia.*
- Mosimann, Carla, Thomas Oberhänsli, Dominik Ziegler, Dinah Nassal, Ellen Kandeler, Thomas Boller, Paul Mäder, and Cécile Thonar. 2017. "Tracing of Two *Pseudomonas* Strains in the Root and Rhizoplane of Maize, as Related to Their Plant Growth-Promoting Effect in Contrasting Soils." *Frontiers in Microbiology* 7 (JAN): 1–14. doi:10.3389/fmicb.2016.02150.
- Muñoz-Rojas, J., and J. Caballero-Mellado. 2003. "Population Dynamics of *Gluconacetobacter Diazotrophicus* in Sugarcane Cultivars and Its Effect on Plant Growth." *Microbial Ecology* 46 (4): 454–64. doi:10.1007/s00248-003-0110-3.
- Muñoz-Rojas, Jesús. 2011. "Seminario de Investigación Y Cultura Óscar Sánchez Daza."
- Muñoz-Rojas, Jesús, Luis E. Fuentes-Ramírez, and Jesús Caballero-Mellado. 2005. "Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* Strains in Culture Media and in Endophytic Association." *FEMS Microbiology Ecology* 54 (1): 57–66. doi:10.1016/j.femsec.2005.02.011.
- Ngumbi, Esther, and Joseph Kloepper. 2016. "Bacterial-Mediated Drought Tolerance: Current and Future Prospects." *Applied Soil Ecology* 105. Elsevier B.V.: 109–25. doi:10.1016/j.apsoil.2016.04.009.
- Noumavo, Pacôme A., Eméric Kochoni, Yédéou O. Didagbé, Adolphe Adjanohoun, Marcellin Allagbé, Rachidatou Sikirou, Emma W. Gachomo, Simeon O. Kotchoni,

- and Lamine Baba-Moussa. 2013. “Effect of Different Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Maize Seed Germination and Seedling Development.” *American Journal of Plant Sciences* 4 (5): 1013–21. doi:10.4236/ajps.2013.45125.
- Oliveira, a. L M, M. Stoffels, M. Schmid, V. M. Reis, J. I. Baldani, and a. Hartmann. 2009. “Colonization of Sugarcane Plantlets by Mixed Inoculations with Diazotrophic Bacteria.” *European Journal of Soil Biology* 45 (1). Elsevier Masson SAS: 106–13. doi:10.1016/j.ejsobi.2008.09.004.
- Ortíz-Castro, Randy, Hexon Angel Contreras-Cornejo, Lourdes Macías-Rodríguez, and José López-Bucio. 2009. “The Role of Microbial Signals in Plant Growth and Development.” *Plant Signaling & Behavior* 4 (8): 701–12. doi:10.4161/psb.4.8.9047.
- Panikov, Nicolai S., Manolis Mandalakis, Shujia Dai, Lawrence R. Mulcahy, William Fowle, Wendy S. Garrett, and Barry L. Karger. 2015. “Near-Zero Growth Kinetics of *Pseudomonas putida* Deduced from Proteomic Analysis.” *Environmental Microbiology* 17 (1): 215–28. doi:10.1111/1462-2920.12584.
- Paulino-Flores, Miriam, Ángel Roberto Martínez-Campos, Francisco Ernesto Martínez-Castañeda, Carlos Alfonso López-Orona, Ivonne Vizcarra-Bordi, and Nora Munguía. 2017. “Evaluation of the Sustainability of Hybrid and Native Maize Production Systems.” *Journal of Cleaner Production* 150: 287–93. doi:10.1016/j.jclepro.2017.02.182.
- Pazos-Rojas, Laura Abisaí, Vianey Marín-cevada, Yolanda Elizabeth, Morales García, and Antonino Baez. 2016. “Uso de Microorganismos Benéficos Para Reducir Los Daños Causados Por La Revolución Verde.” *Revista Iberoamericana de Ciencias* 3 (7): 72–85.
- Pérez-Miranda, S., N. Cabirol, R. George-Téllez, L. S. Zamudio-Rivera, and F. J. Fernández. 2007. “O-CAS, a Fast and Universal Method for Siderophore Detection.” *Journal of Microbiological Methods* 70 (1): 127–31. doi:10.1016/j.mimet.2007.03.023.
- Pikovskaya, R.I. 1948. “Mobilization of Phosphorus in Soil in Connection with Vital Activity of Some Microbial Species.” *Mikrobiologiya* 17: 362–70.
- Planchamp, Chantal, Gaetan Glauser, and Brigitte Mauch-Mani. 2014. “Root Inoculation with *Pseudomonas putida* KT2440 Induces Transcriptional and Metabolic Changes and Systemic Resistance in Maize Plants.” *Frontiers in Plant Science* 5 (JAN): 719. doi:10.3389/fpls.2014.00719.
- Potts, Malcolm. 1994. “Desiccation Tolerance of Prokaryotes.” *Microbiological Reviews* 58 (4): 755–805. doi:10.1093/icb/45.5.800.
- Rajkumar, M., S. Sandhya, M. N.V. Prasad, and H. Freitas. 2012. “Perspectives of Plant-Associated microbes in heavy metal Phytoremediation.” *Biotechnology Advances* 30 (6). Elsevier Inc.: 1562–74. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.04.011.
- Ramírez et al. 2003. “Maíz Azul De Los Valles Altos De México. I . Rendimiento De

- Grano Y Caracteres Agronómicos Blue Maize From the Mexican High Lands. I. Grain Yield and Agronomic Traits.” *Revista Fitotecnia Mexicana Rev. Fitotec. Mex* 26 (262): 101–7. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61026205>.
- Reddy, Chilekampalli A, and Ramu S Saravanan. 2013. “Polymicrobial Multi-Functional Approach for Enhancement of Crop Productivity.” *Advances in Applied Microbiology* 82 (January): 53–113. doi:10.1016/B978-0-12-407679-2.00003-X.
- Reina-Bueno, Mercedes, Montserrat Argandoña, Joaquín J Nieto, Alba Hidalgo-García, Fernando Iglesias-Guerra, María J Delgado, and Carmen Vargas. 2012. “Role of Trehalose in Heat and Desiccation Tolerance in the Soil Bacterium *Rhizobium etli*.” *BMC Microbiology* 12: 207. doi:10.1186/1471-2180-12-207.
- Riley, M A. 2009. “Bacteriocins, Biology, Ecology and Evolution.” *Encyclopedia of Microbiology*, 32–44.
- Riley &, and Wertz. 2002. “Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application.” *Annual Review of Microbiology* 56 (1): 117–37. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.161024.
- Riley, and Wertz. 2002. “Bacteriocin Diversity: Ecological and Evolutionary Perspectives.” *Biochimie* 84 (5–6): 357–64. doi:S0300908402014219 [pii].
- Rodríguez-Andrade, Osvaldo, Luis E Fuentes-Ramírez, Yolanda E Morales-García, Dalia Molina-Romero, María R Bustillos-Cristales, Rebeca D Martínez-Contreras, and Jesús Muñoz-Rojas. 2015. “The Decrease in the Population of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in Sugarcane after Nitrogen Fertilization Is Related to Plant Physiology in Split Root Experiments.” *Revista Argentina de Microbiología* 47 (4): 335–43. doi:10.1016/j.ram.2015.09.004.
- Rojas-Tapias, Daniel Fernando, Ruth Bonilla, and Jenny Dussán. 2014. “Effect of Inoculation and Co-Inoculation of *Acinetobacter* Sp. RG30 and *Pseudomonas putida* GN04 on Growth, Fitness, and Copper Accumulation of Maize (*Zea mays*).” *Water, Air, and Soil Pollution* 225 (12). doi:10.1007/s11270-014-2232-2.
- Rojas-Tapias, Andrés Moreno-Galván, Sergio Pardo-Díaz, Melissa Obando, Diego Rivera, and Ruth Bonilla. 2012. “Effect of Inoculation with Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) on Amelioration of Saline Stress in Maize (*Zea mays*).” *Applied Soil Ecology* 61 (October 2012). Elsevier B.V.: 264–72. doi:10.1016/j.apsoil.2012.01.006.
- Rumjanek, N. G., R. C. Dobert, P. Van Berkum, and E. W. Triplett. 1993. “Common Soybean Inoculant Strains in Brazil Are Members of *Bradyrhizobium elkanii*.” *Applied and Environmental Microbiology* 59 (12): 4371–73.
- Saia, Sergio, Vito Rappa, Paolo Ruisi, Maria Rosa Abenavoli, Francesco Sunseri, Dario Giambalvo, Alfonso S. Frenda, and Federico Martinelli. 2015. “Soil Inoculation with Symbiotic Microorganisms Promotes Plant Growth and Nutrient Transporter Genes Expression in Durum Wheat.” *Frontiers in Plant Science* 6 (October): 1–10. doi:10.3389/fpls.2015.00815.

- Saleem, Muhammad, Muhammad Arshad, Sarfraz Hussain, and Ahmad Saeed Bhatti. 2007. "Perspective of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) Containing ACC Deaminase in Stress Agriculture." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 34 (10): 635–48. doi:10.1007/s10295-007-0240-6.
- Salinas-Moreno, Yolanda, Soria Ruiz Jesús, and Espinosa Trujillo Edgar. 2010. "Aprovechamiento Y Distribución de Maíz Azul En El Estado de México." *Inifap* 42: 50.
- Salvador, Ricardo J. 2001. *Maíz*. Edited by Universidad Autónoma de Chapingo. 15th ed. Chapingo, México: Publicaciones del Programa Nacional de Etnobotánica.
- Sandhya, V., Sk Z. Ali, Minakshi Grover, Gopal Reddy, and B. Venkateswarlu. 2010. "Effect of Plant Growth Promoting *Pseudomonas* spp. on Compatible Solutes, Antioxidant Status and Plant Growth of Maize under Drought Stress." *Plant Growth Regulation* 62 (1): 21–30. doi:10.1007/s10725-010-9479-4.
- Santiago-Saenz & Muñoz-Rojas. 2014. "Efecto de Un Inoculante Multi-Especies (EMMIM-1) En Papa *Solanum tuberosum*, Cv. Atlantic Propagada En El Laboratorio Y Crecida En Invernadero." Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Sarma, Birinchi Kumar, Sudheer Kumar Yadav, Surendra Singh, and Harikesh Bahadur Singh. 2015. "Microbial Consortium-Mediated Plant Defense against Phytopathogens: Readdressing for Enhancing Efficacy." *Soil Biology and Biochemistry* 87. Elsevier Ltd: 25–33. doi:10.1016/j.soilbio.2015.04.001.
- Shahzad, Sher Muhammad, Muhammad Saleem Arif, Muhammad Riaz, Zafar Iqbal, and Muhammad Ashraf. 2013. "PGPR with Varied ACC-Deaminase Activity Induced Different Growth and Yield Response in Maize (*Zea mays* L.) under Fertilized Conditions." *European Journal of Soil Biology* 57 (July): 27–34. doi:10.1016/j.ejsobi.2013.04.002.
- Shahzad, Sher Muhammad, Azeem Khalid, Muhammad Saleem Arif, Muhammad Riaz, Muhammad Ashraf, Zafar Iqbal, and Tahira Yasmeen. 2014. "Co-Inoculation Integrated with P-Enriched Compost Improved Nodulation and Growth of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) under Irrigated and Rainfed Farming Systems." *Biology and Fertility of Soils* 50 (1): 1–12. doi:10.1007/s00374-013-0826-2.
- Sheng, Xiafang, Leni Sun, Zhi Huang, Linyan He, Wenhui Zhang, and Zhaojin Chen. 2012. "Promotion of Growth and Cu Accumulation of Bio-Energy Crop (*Zea mays*) by Bacteria: Implications for Energy Plant Biomass Production and Phytoremediation." *Journal of Environmental Management* 103. Elsevier Ltd: 58–64. doi:10.1016/j.jenvman.2012.02.030.
- Singh, Akanksha, Akansha Jain, Birinchi Kumar Sarma, Ram S. Upadhyay, and Harikesh Bahadur Singh. 2014. "Rhizosphere Competent Microbial Consortium Mediates Rapid Changes in Phenolic Profiles in Chickpea during *Sclerotium rolfsii* Infection." *Microbiological Research* 169 (5–6). Elsevier GmbH.: 353–60. doi:10.1016/j.micres.2013.09.014.

- Streeter, J. G. 2003. "Effect of Trehalose on Survival of *Bradyrhizobium japonicum* during Desiccation." *Journal of Applied Microbiology* 95 (3): 484–91. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02017.x.
- Suárez, Morales, and Amanda Gálvez. 2013. "Importance of Mexican Maize Landraces in the National Diet . an Essential Review." *Revista Fitotecnia Mexicana* 36: 275–83.
- Sundaramoorthy, S., T. Raguchander, N. Ragupathi, and R. Samiyappan. 2012. "Combinatorial effect of endophytic and Plant Growth Promoting Rhizobacteria against wilt disease of *Capsicum annum* L. Caused by *Fusarium solani*." *Biological Control* 60 (1). Elsevier Inc.: 59–67. doi:10.1016/j.biocontrol.2011.10.002.
- Thakur, Rishu, K. C. Sharma, Ashu Gulati, R. K. Sud, and Arvind Gulati. 2017. "Stress-Tolerant *Viridibacillus arenosi* Strain IHB B 7171 from Tea Rhizosphere as a Potential Broad-Spectrum Microbial Inoculant." *Indian Journal of Microbiology* 57 (2). Springer India: 195–200. doi:10.1007/s12088-017-0642-8.
- Thilagar, G., D. J. Bagyaraj, and M. S. Raoca. 2016. "Selected Microbial Consortia Developed for Chilly Reduces Application of Chemical Fertilizers by 50% under Field Conditions." *Scientia Horticulturae* 198. Elsevier B.V.: 27–35. doi:10.1016/j.scienta.2015.11.021.
- Timmusk, S, and E G Wagner. 1999. "The Plant-Growth-Promoting Rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* Induces Changes in *Arabidopsis thaliana* Gene Expression: A Possible Connection between Biotic and Abiotic Stress Responses." *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI* 12 (11): 951–59. doi:10.1094/MPMI.1999.12.11.951.
- Ullah, Sami, and Asghari Bano. 2015. "Isolation of Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria from Rhizospheric Soil of Halophytes and Their Impact on Maize (*Zea mays* L.) under Induced Soil Salinity." *Canadian Journal of Microbiology* 61 (4). National Research Council of Canada: 307–13. doi:10.1139/cjm-2014-0668.
- Vacheron, Jordan, Guilhem Desbrosses, Marie-Lara Bouffaud, Bruno Touraine, Yvan Moëgne-Loccoz, Daniel Muller, Laurent Legendre, Florence Wisniewski-Dyé, and Claire Prigent-Combaret. 2013. "Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Root System Functioning." *Frontiers in Plant Science* 4 (September): 1–19. doi:10.3389/fpls.2013.00356.
- Van Loon, L. C. 2007. "Plant responses to Plant Growth-Promoting Rhizobacteria." *European Journal of Plant Pathology* 119 (3): 243–54. doi:10.1007/s10658-007-9165-1.
- Velázquez-Hernández, M. Lourdes, Víctor M. Baizabal-Aguirre, Fermín Cruz-Vázquez, Mayra J. Trejo-Contreras, Luis E. Fuentes-Ramírez, Alejandro Bravo-Patiño, Marcos Cajero-Juárez, Martha P. Chávez-Moctezuma, and Juan J. Valdez-Alarcón. 2011. "*Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase is involved in tolerance to NaCl, sucrose and desiccation, and in Biofilm Formation." *Archives of Microbiology* 193 (2): 137–49. doi:10.1007/s00203-010-0651-z.

- Vílchez, Juan I., Cristina García-Fontana, Desireé Román-Naranjo, Jesús González-López, and Maximino Manzanera. 2016. "Plant drought tolerance enhancement by Trehalose production of desiccation-tolerant Microorganisms." *Frontiers in Microbiology* 7 (SEP): 1–11. doi:10.3389/fmicb.2016.01577.
- Vilchez, S., and Maximino Manzanera. 2011. "Biotechnological Uses of Desiccation-Tolerant Microorganisms for the Rhizoremediation of soils subjected to seasonal Drought." *Applied Microbiology and Biotechnology* 91 (5): 1297–1304. doi:10.1007/s00253-011-3461-6.
- Vivanco-Calixto, R., D. Molina-Romero, Morales-García Y.E., Quintero-Hernández V., Munive-Hernández A., Baez-Rogelio A., and Muñoz-Rojas J. 2016. "Reto Agrobiotecnológico: Inoculantes Bacterianos de segunda Generación." *Alianzas Y Tendencias* 1 (April): 9–19.
- Vurukonda, Sai Shiva Krishna Prasad, Sandhya Vardharajula, Manjari Shrivastava, and Ali SkZ. 2016. "Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth Promoting Rhizobacteria." *Microbiological Research* 184. Elsevier GmbH.: 13–24. doi:10.1016/j.micres.2015.12.003.
- Wang, Chun Juan, Wei Yang, Chao Wang, Chun Gu, Dong Dong Niu, Hong Xia Liu, Yun Peng Wang, and Jian Hua Guo. 2012. "Induction of drought tolerance in cucumber plants by a Consortium of Three Plant Growth-Promoting Rhizobacterium Strains." *PLoS ONE* 7 (12): 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0052565.
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D a Pelletie, D. J. Lane, D. a. Pelletier, and D. J. Lane. 1991. "16S Ribosomal DNA amplification for Phylogenetic Study." *Journal of Bacteriology* 173 (2): 697–703. doi:n.a.
- Žalud, Zdeněk, Petr Hlavinka, Karel Prokeš, Daniela Semerádová, Balek Jan, and Miroslav Trnka. 2017. "Impacts of water availability and drought on Maize Yield – A Comparison of 16 Indicators." *Agricultural Water Management* 188: 126–35. doi:10.1016/j.agwat.2017.04.007.
- Zoppellari, F, E Malusa, W Chitarra, C Lovisolo, F Spanna, and L Bardi. 2014. "Improvement of drought tolerance in Maize (*Zea mays* L.) by Selected Rhizospheric Microorganisms." *Italian Journal of Agrometeorology-Rivista Italiana Di Agrometeorologia* 19 (1): 5–18.