



BUAP.

**Benemérita Universidad Autónoma de
Puebla.**

Facultad de Ingeniería Química

**EFFECTOS DE LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS
PROMOTORAS DE CRECIMIENTO EN PLANTACIONES DE
BLUEBERRY.**

Que para obtener el título de Ingeniero Ambiental

Presenta:

Sigrid Eugenia Cazares Esquivel

Director de tesis:

Dr. José Carlos Mendoza Hernández.

Puebla, Puebla. Julio 2016.

ÍNDICE

ÍNDICE	III
DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
JUSTIFICACIÓN.....	2
OBJETIVO GENERAL.....	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
HIPÓTESIS.....	4
CAPÍTULO I.....	5
Antecedentes.....	5
1.1 Importancia y descripción de la planta.....	5
1.2 Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal.....	7
1.3 Promoción del crecimiento vegetal mediante PGPB.....	9
1.4 Mecanismos de promoción del crecimiento en plantas.....	10
CAPÍTULO II.....	13
Metodología.....	13
2.1 Localización del experimento.....	13
2.1.1 Toma de muestras de suelo.....	14
2.1.2 Aislamiento.....	15
2.1.3 Solubilización de fosfatos.....	15
2.1.4 Producción de sideróforos.....	17
2.1.6 Ácido Indol Acético (AIA).....	19
2.2 Diseño experimental.....	21

2.2.1 Preparación del inóculo.	21
2.3 Etapas del trabajo en campo.	23
2.3.1 Inoculación en campo.	23
2.3.2 Muestreo.	25
2.3.4 Determinación de clorofilas a, b y totales.	25
2.3.5 Determinación de antocianinas.	28
2.3.6 Cuantificación de macro y micro nutrientes en hojas y frutas.	29
CAPÍTULO III	30
Resultados.	30
3.1 Mediciones de longitud, diámetro del tallo, hojas, ramas y flores.	30
3.2 Concentración de AIA.	32
3.3 Concentración de ACC Desaminasa.	33
3.4 Cuantificación de clorofilas en las hojas y plantas	34
3.5 Cuantificación de antocianinas en frutas.	35
3.6 Concentración de Cu.	36
3.7 Concentración de Zn.	37
3.8 Concentración de Fe.	38
3.9 Concentración de Na.	39
3.10 Concentración Mn.	40
3.11 Concentración de P.	41
3.12 Concentración de K.	42
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFÍA.	44

EFFECTOS DE LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO EN PLANTACIONES DE BLUEBERRY.

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El blueberry, o mora azul, es un arándano que crece como arbusto pequeño en zonas con clima templado – húmedo y un pH5 en el suelo, pertenece al género “*Vaccinium*”. Originaria de Estados Unidos de América ha sido bien aceptada en otros países e introducida en México en el año de 1971 (Carlson, 1983).

En la región de la Sierra Norte del Estado de Puebla cerca de la ciudad de Zacatlán se cultiva el 85% del producto nacional que se exporta a Estados Unidos de América (Rancho la concordia, 2003). Los habitantes de las comunidades productoras de blueberry exportan la fruta que cumple con los estándares de calidad “CERTIMEX USA MEX” y el resto que se denomina “fruta para proceso” es utilizada en la elaboración artesanal de diferentes productos como: mermeladas, néctar, vinos y licores, chocolates, cremas de licor entre otros (Dirección de Desarrollo Rural del Municipio de Zacatlán, 2015).

El blueberry es una fruta con una amplia gama de propiedades entre las que destacan un alto contenido de vitamina C, vitamina E, grandes cantidades de antocianinas en comparación con otros arándanos, antioxidantes que son un factor importante para la prevención de enfermedades crónico degenerativas, efectos antienvjecimiento, ya que en investigaciones acerca del cerebro se ha descubierto que pueden revertir la pérdida de memoria a corto plazo y mejorar las habilidades motoras, prevención de enfermedades del tracto urinario, prevención del cáncer y mejorar la visión

Los productores de esta zona, pertenecientes a la asociación “Agropecuaria y Frutícola Xoxonacatla S.C. de R.L. de C.V.” han manifestado el interés en la aplicación de nuevas tecnologías que sean sustentables y tengan un efecto positivo en el crecimiento de sus cultivos, disminuyan el uso de fertilizantes químicos y por consiguiente tengan un menor impacto en los suelos de sus cultivos, todo esto debido a una notable disminución en la producción anual a causa de diversos factores ambientales como el cambio climático, la mala planeación y preparación de suelos de cultivo, la falta de estudios que indiquen la disponibilidad de nutrientes en los suelos y el escaso apoyo por parte de los gobiernos municipales a este sector.

JUSTIFICACIÓN.

Desde que se generó el concepto de rizósfera, diversos estudios se han realizado sobre su composición física, química y biológica; dentro de estos, el estudio sobre los microorganismos presentes en el suelo ha dejado un amplio espacio de oportunidad a la investigación en el mejoramiento de los suelos, la agricultura, sustentable y la disminución en el uso de fertilizantes químicos en el suelo. Entre estos microorganismos se han encontrado diversos conjuntos de bacteria que han sido identificados por su actividad de biocontrol (Zhuang X,2007.)

Las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal también conocidas como PGPB (del inglés **P**lant **G**rowth **P**romotig **B**acteria) han sido utilizadas en diversas investigaciones obteniendo resultados favorables y mostrándose como una alternativa, viable y sustentable para el mejoramiento agrícola debido a su capacidad para la estimulación directa del crecimiento de las plantas.

Las PGPB benefician a las plantas mediante diferentes mecanismos como la fijación de N₂, producción de fitohormonas, sideróforos, solubilización de fosfatos, síntesis de enzimas que alteran los niveles de fitohormonas y el biocontrol de fitopatógenos (Glick *et al.*, 1999) este, viéndose reflejado en el aumento de producción y calidad en los cultivos.

El sector agrícola en la región de la Sierra Norte de Puebla representa uno de los mayores retos para la investigación, el mejoramiento y aumento de la producción agrícola, es una acción importante para reducir la pobreza, la desnutrición y proporcionar la economía necesaria a las personas que dependen de este oficio.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el efecto de la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento en cultivos de blueberry, para incrementar la producción.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Aislar bacterias promotoras del crecimiento de la rizósfera de cultivos de blue Berry.
- Caracterizar bioquímicamente bacterias para seleccionar a las que funcionen como promotoras de crecimiento.
- Inocular en campo con bacterias promotoras del crecimiento.
- Analizar el efecto de las PGPB en la concentración de nutrientes (Cu, P, K Na, Mg, Fe, Zn) presentes en las hojas y en las frutas.
- Cuantificar la concentración de antocianinas presentes en los frutos.
- Cuantificar la concentración de clorofilas a, b y totales presentes en las hojas.

HIPÓTESIS.

H₀: La inoculación en los arbustos de blueberry con bacterias promotoras del crecimiento no tendrá efecto positivo en el desarrollo de estas.

H₁: La inoculación en los arbustos de blueberry con bacterias promotoras del crecimiento tendrá efecto positivo en el desarrollo de estas.

CAPÍTULO I

Antecedentes.

1.1 Importancia y descripción de la planta.

Los blueberries constituyen un grupo de plantas arbustivas originarias del Hemisferio Norte. Desde el punto de vista de la clasificación botánica comprenden diversas especies pertenecientes al género *Vaccinium*, familia de las Ericáceas, la misma familia de la que forman parte azaleas y rododendros. (Vergel, 2003)

Las especies más importantes, de las que parten todas las variedades comerciales producidas por los distintos obtentores, a través de largos y prolijos trabajos fitotécnicos son las siguientes: *Vaccinium angustifolium* (*lowbush*) *Vaccinium corymbosum* (*highbush*) *Vaccinium ashei* (*rabbiteye*) *V. corymbosum* híbrido (*southern highbush*), de estas especies, puras o cruzadas con otras del mismo género, derivan las variedades que se utilizan para producir fruta. (Vergel, 2003)

Los blueberries, tienen un sistema radicular superficial y fibroso que puede explorar el suelo hasta los 25-30 cm. Existen raíces más profundas que son gruesas y cumplen funciones de sostén. (Rancho la Concordia, 2003)

Los tallos son marrones o amarillentos. Crecen desde la base o cuello de la planta, llamado corona, llevando una gran cantidad de yemas florales en la zona apical. Son globosas y se distinguen muy fácilmente de las vegetativas. Las flores son simples. Se disponen en racimos de 5 a 10 cada uno. (Rancho la Concordia, 2003)

Los frutos son una baya (berry) de forma esférica de 1 a 2 cm de diámetro, de color azul en distintas tonalidades desde el intenso a suave. Su epidermis está

recubierta por una serosidad característica. Esto es importante pues, junto con la consistencia que posee, hace que la durabilidad post cosecha sea mucho mayor que la de otros berries (frambuesa, frutilla, boysenberry) (Vergel, 2003).

El tiempo que tarda para desarrollarse, es decir el tiempo que transcurre entre floración y maduración es variable. Existen diferencias varietales que resultan ser muy importantes dado que aquellas con períodos cortos de desarrollo están más capacitadas para escapar de heladas tardías que suelen ocurrir. (Carlson, 1983)

El consumo de blueberry en norte América se encuentra en segundo lugar después de las fresas en popularidad. Forma parte de la dieta de los habitantes de EE.UU. ya que tienen una de las más altas capacidades antioxidantes por sobre todas las frutas, verduras, especies y condimentos. Siendo una de las pocas frutas originalmente nativas de Norteamérica, el blueberry ha sido consumido por los nativos durante cientos de años, y se ha ido popularizando en diferentes partes del mundo como Asia y el mediterráneo (Vergel,2003).

La producción de arándanos comenzó hace varios años en el estado de Puebla en la región de la Sierra Norte, donde las variedades *Vaccinium ashei* que son arbustos de tamaño mediano y hojas caedizas que se vuelven de color rojo intenso en otoño antes de caer, han prosperado con un buen clima y suelo. Lo que agregado a la belleza de sus flores y frutos le otorgan una importante cualidad ornamental, independientemente de sus características productivas (Carlson, 1983).

Durante la cuarta cumbre de la Organización Internacional del Arándano, llevada a cabo en el año 2014 en Guadalajara México, se destacó el potencial que México está ganando dentro de la industria del blueberry. México tiene el potencial de ser un elemento de cambio dentro del negocio global de arándanos a causa de su larga temporada, las innovaciones de los productores, nuevas variedades y la proximidad al mercado contra-estacional de los EE. UU. "México está elevando las expectativas y va a cambiar el panorama para el mercado de América del Norte, poniendo presión sobre la producción final de la temporada local", Cort Brazelton, Director de Desarrollo de Negocios y Negocios Internacionales de Fall Creek Farm & Nursery dijo a los delegados en la reunión de relleno.

1.2 Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal.

La rizósfera es el ambiente que está bajo la influencia de las raíces de las plantas, donde existe un flujo de compuestos orgánicos producto de la fotosíntesis que son exudados por la raíz (Barea y Azcón-Aguilar, 1982). Desde que Hiltner la definió en 1904, se han realizado grandes avances en su investigación que reconocen el papel que tienen los microorganismos rizosféricos en el crecimiento de las plantas (Bowen y Rovira, 1999). La rizósfera es el hábitat ecológico en el cual los microorganismos están en contacto directo con la raíz de las plantas (Arshad y Frankenberger, 1998) y es el sitio donde se dan diversas interacciones, como: competencia, mutualismo, comensalismo, amensalismo, predación y parasitismo (Barea y Azcón-Aguilar, 1982).

Las bacterias son capaces de comunicarse entre ellas y con otros organismos por estímulos, los cuales, son liberados al ambiente y las células bacterianas cercanas a la inducción lo traducen e informan a otras células bacterianas como respuesta a éste, dichas interacciones entre plantas y microorganismos son un fenómeno bastante bien documentado (Galicia-Jiménez et al., 2011) que representa beneficios al crecimiento de la planta a través de simbiosis entre ambos, lo que se ve reflejado en la promoción del crecimiento de las plantas y la colonización de las rizobacterias en las raíces. Cuando las rizobacterias aprovechan el microambiente favorable de la planta, sin formar estructuras de novo sobre la raíz, se habla entonces de una simbiosis asociativa (Echegaray-Alemán, 1995).

Muchas bacterias asociativas son consideradas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) debido a su capacidad para estimular directamente el crecimiento de las plantas a través de diversos mecanismos, como el aporte de nitrógeno por el proceso de fijación biológica de nitrógeno atmosférico (Boonjawat et al., 1991; Elmerich et al., 1992; Döbereiner et al., 1995), producción de sustancias reguladoras del crecimiento (Arshad y Frankenberger, 1998), solubilización de minerales y nutrientes (Crowley et al., 1991), incremento en el volumen de la raíz (Bowen y Rovira, 1999), inducción de resistencia sistémica a patógenos (Van Peer et al., 1991), inhibición del crecimiento de organismos antagónicos (Utkhede et al., 1999) e interacción sinérgica con otros microorganismos del suelo (Bashan et al., 1996b).

Muchos aspectos importantes de las interacciones suelo-planta son mediados por los procesos de la rizósfera, incluyendo la adquisición de nutrientes por la planta, la colonización de las raíces por los microorganismos y la descomposición de la materia orgánica (Cheng, 1999).

1.3 Promoción del crecimiento vegetal mediante PGPB.

El proceso por el cual las bacterias se mueven hacia la raíz y la colonizan, no es muy claro, no obstante, se han propuesto algunos factores que favorecen este proceso, como una mayor disponibilidad de carbono (Sprent y D’Faria, 1988), condiciones favorables de humedad (Herman *et al.*, 1994), tiempo de generación y quimiotaxis (Mandinba *et al.*, 1986; Bowen y Rovira, 1999), aerotaxis (Zhulin *et al.*, 1996), adhesión (Boonjawat *et al.*, 1991; Paul y Clark, 1996) y la capacidad de movimiento (Beauchamp *et al.*, 1991). La quimiotaxis, se refiere al movimiento de los microorganismos hacia la raíz, en respuesta a un gradiente de concentración de nutrientes o de otros estímulos producidos por las plantas. La quimiotaxis puede ser una respuesta a sustratos específicos y no específicos de la raíz, así como a gradientes de dióxido de carbono.

La capacidad de las bacterias para afectar el crecimiento de las plantas no sólo depende de su abundancia, sino de su capacidad para proliferar a través de la raíz (Loper *et al.*, 1985). En general, las bacterias inoculadas en la semilla colonizan sólo el primer tercio del sistema radical (Hatzinger y Alexander, 1994), aunque algunas, como *Azospirillum*, pueden moverse de la semilla inoculada y distribuirse en todo el sistema radical, en respuesta al propio crecimiento de la raíz (Bashan y Levanony, 1991).

1.4 Mecanismos de promoción del crecimiento en plantas.

Cuando se reconoció el papel de las bacterias de la rizósfera en la promoción del crecimiento de las plantas, su efecto se atribuyó a su facultad para fijar nitrógeno. Sin embargo, en las últimas décadas se ha destacado su importancia como promotoras del desarrollo, debido a su capacidad para sintetizar metabolitos o sustancias reguladoras del crecimiento. Estas sustancias son compuestos naturales que afectan procesos de las plantas a concentraciones más bajas de las que presentan nutrientes o vitaminas. Hay cinco clases de reguladores del crecimiento vegetal sintetizados por las plantas: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno y ácido abscísico (Arshad y Frankenberger, 1998). Cuando estos metabolitos son producidos en forma endógena por las plantas, se les denomina hormonas vegetales o fitohormonas.

El término "reguladores del crecimiento de las plantas" es usado por la industria de agroquímicos para nombrar a los compuestos sintéticos que tienen propiedades para regular el crecimiento de las plantas; en general, este término se utiliza cuando las hormonas de las plantas son producidas por microorganismos de la rizósfera (Arshad y Frankenberger, 1998).

La producción de sustancias promotoras del crecimiento, aparentemente, es una respuesta de las bacterias a la producción de sustancias de la planta hacia la rizosfera. Por ejemplo, *A. chroococcum* produce ácido indol-3-acético (AIA) a partir del triptofano, el cual es exudado por la raíz de las plantas (Brown, 1972) y puede sintetizar auxinas, giberelinas y citocininas, cuando se cultiva en un medio libre de nitrógeno y se adicionan exudados de raíces de maíz (Martínez et al., 1988).

Cuando producen citocininas en forma abundante, los precursores más efectivos son la adenina (ADE) y el alcohol isopentílico (AI) (Arshad y Frankenberger, 1991; Nieto y Frankenberger, 1991). Arshad y Frankenberger (1998) presentaron un modelo hipotético de las relaciones entre PGPB y las plantas. En este modelo, el

ácido indolacético (AIA), sintetizado por una bacteria que está adherida a la superficie de la semilla, o bien, a la raíz de una planta.

Con el AIA endógeno de la planta puede estimular la división y alargamiento de la célula, o bien, promover la síntesis de ácido 1-amino-ciclopropano-1- carboxílico (ACC) con la activación de la enzima ACC sintasa. Éste es un compuesto precursor inmediato de etileno en las plantas superiores. En el último caso, la síntesis de ACC dentro de la planta se aumenta. Una porción significativa del ACC puede ser exudado por las raíces de la planta o por las semillas (junto con otras moléculas normalmente presentes en semilla o exudados de la raíz) y, entonces, es tomado activamente por la bacteria e hidrolizado por la enzima ACC desaminasa, transformándolo en α -cetobutirato y amonio. La bacteria induce a la planta a sintetizar más ACC que lo que necesita, para tener una fuente de nitrógeno para la bacteria (el ACC). Una consecuencia directa de bajar la cantidad de ACC dentro de la planta (tanto el endógeno, como el AIA-estimulado) es la reducción de etileno dentro de la planta, a tal grado, que se puede provocar la inhibición de la elongación de la radícula. Uno de los efectos más importantes es la modificación de la morfología de la raíz, que incluye una fitoestimulación de este órgano y un incremento significativo en la formación de pelos radicales (Dobbelaere et al., 1999). La modificación de la morfología de los pelos radicales debida a las sustancias promotoras del crecimiento, favorece la permeabilidad de la raíz a ciertos iones (Chalk, 1991)

De acuerdo con lo revisado hasta ahora, las bacterias promotoras del crecimiento pueden favorecer el desarrollo de los cultivos debido a su capacidad para fijar N_2 , o bien, por la producción de hormonas que ocasionan cambios en la morfología de la raíz que inducen a una mayor adquisición de nutrimentos.

No obstante, los microorganismos de la rizósfera pueden afectar la nutrición mineral de las plantas en forma desfavorable cuando compiten por nutrientes, cuando inmovilizan los nutrientes minerales o cuando consumen los solutos orgánicos que las raíces liberan para movilizar nutrientes solubles escasos en la solución del suelo (Wirén et al., 1993). En relación con las bacterias promotoras del crecimiento, los efectos son favorables, debido a que algunas de ellas tienen la capacidad de producir compuestos quelatados que incrementan la solubilidad del Fe en la rizósfera (Crowley *et al.*, 1988). Las plantas y los microorganismos incrementan la liberación de exudados en la rizósfera, en especial ácidos orgánicos, en condiciones de estrés. Un ejemplo de lo anterior es la liberación de ácidos orgánicos en respuesta a una deficiencia de hierro (Jones *et al.*, 1996). Este hecho afecta la distribución de bacterias en las zonas de la raíz en función del estado nutricional del hierro en las plantas (Yang y Crowley, 2000). Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular secretados por las raíces de las plantas y las bacterias que actúan capturando elementos, como el hierro, en la rizósfera.

CAPÍTULO II

Metodología.

2.1 Localización del experimento.

Este estudio se ubicó en el barrio de Tlaltempan Buenavista perteneciente al municipio de Jilotzingo en la ciudad de Zacatlán Puebla, aproximadamente a 30 km del centro de la ciudad. Siendo la entrada a la sierra Norte del Estado de Puebla como se muestra en la figura 1, su clima es templado húmedo con abundantes lluvias en verano (58%), templado subhúmedo con lluvias en verano (24%), templado húmedo con lluvias todo el año (16%) y semicálido húmedo con lluvias todo el año (2%) y un rango de temperatura que va de los 12 a los 20°C y un rango de precipitación de 700 a 2100 mm, con un suelo dominante andosol (40%) (INEGI, 2009)



Figura 1. Ubicación geográfica del experimento

2.1.1 Toma de muestras de suelo.

Se tomaron 50 muestras de la rizósfera de una plantación con frutos de calidad de exportación (Figura 2) (aprox. 10 g. cada muestra), cavando alrededor del tallo del arbusto 30 cm aproximadamente a un radio no mayor de 10 cm como se muestra en la figura 2, las muestras se tomaron de forma aleatoria y se mantuvieron en refrigeración (4 °C) durante el traslado al laboratorio y hasta su utilización.



Figura 2. Lugar de muestreo de suelo.



Figura 3. Toma de muestras para el aislamiento.

2.1.2 Aislamiento.

Se pesó 0.5 gramos de suelo y se vertió en tubos de ensaye con 5 mL de caldo Luria Bertani y se dejó en incubación a 30 °C y agitación a 80 rpm durante 48 h. Cada muestra se realizó por duplicado. Posteriormente se aislaron en medios selectivos (Mc Conkey y King A) y medio nutritivo, incubándose por 24 h a 36°C.

Se realizó la purificación de las cepas, sembrándolas de placa a placa mediante la técnica de estría cruzada, esto se hizo hasta obtener cepas perfectamente aisladas como se observa en las Figuras 3 y 4.



Figuras 4 y 5. Cepas aisladas de suelo de plantaciones de blueberry

2.1.3 solubilización de fosfatos.

Se preparó el medio Pikoykaya utilizando 10 g de glucosa, 5 g de fosfato tribásico de calcio, 0.5g de sulfato de amonio, 0.2 g de cloruro de potasio, 0.1 g de sulfato de magnesio heptahidratado, trazas de sulfato de manganeso y sulfato ferroso, 0.5 g de extracto de levadura y 15 g de agar bacteriológico, todo esto en 1L de agua destilada, posteriormente se esterilizó en el autoclave y se vertió en placas Petri. Se sembraron las cepas y se incubaron durante 72 h a 30 °C, la presencia de un halo alrededor de la colonia indica una prueba positiva de solubilización de fosfatos. (Figura 6).

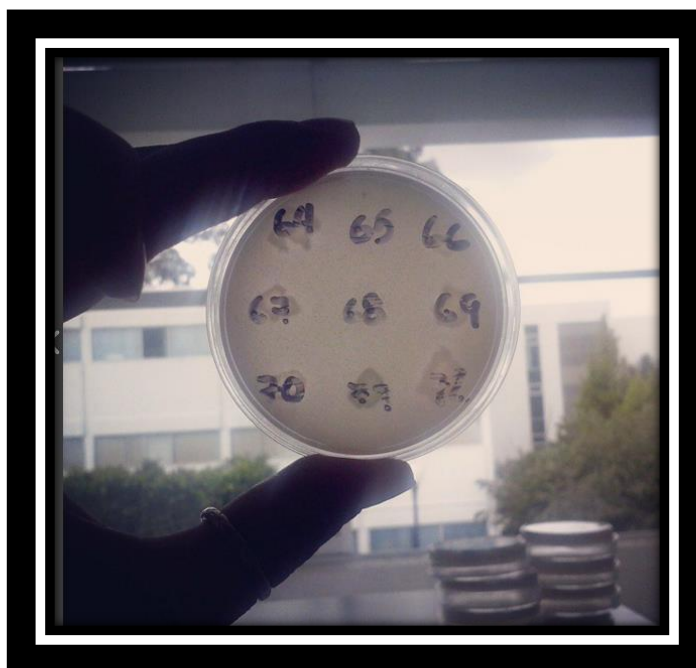


Figura 6. Prueba de solubilización de fosfatos

2.1.4 Producción de sideróforos.

La determinación de sideróforos se realizó de manera cualitativa, usando agar CAS (cromo azurol S). El agar CAS se preparó usando 4 soluciones diferentes que se esterilizaron por separado. Solución A Colorante Azul: solución 1: disolver 0.06 g de CAS en 50 mL de agua destilada. Solución 2: disolver 0.0027 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ en 10 mL de 10 mM HCl; solución 3: se disolvieron 0.073 g de bromuro de hexadeciltrimetilamonio en 40 mL de agua destilada. Posteriormente se mezcló la solución 1 con 9 mL de la solución 2, y luego se adicionó la solución 3. Esta solución presenta un color azul. Se esterilizó por autoclave y se mantuvo en un contenedor de plástico. Solución de mezcla: se preparó la solución de medio mínimo salino (MM9) disolviendo 15 g KH_2PO_4 , 25 g NaCl y 50 g NH_4Cl en 500 mL de agua destilada. Solución de ácido casamino se prepara disolviendo 3 g de casaminoacid en 27 mL de agua destilada, se extrajo con 3% de 8-hidroxiquinollona en cloroformo para remover cualquier traza de hierro y fue esterilizada por filtración. Para preparar el agar CAS se adicionaron 100 mL de MM9 a 750 ml de agua destilada, con 32.24 g de PIPES, se ajustó el pH a 6.8 con KOH 50%, y se adicionaron 15 g de agar bacteriológico, posteriormente se esterilizó por autoclave. Después de esterilizar se adicionaron 30 mL de la solución de ácido casamino en 10 mL de solución estéril de glucosa al 20% y mezcló con la solución de PIPES. Se virtió en placas Petri y se sembraron las cepas aisladas de plantaciones de blueberry, dejando en incubación por 24 h. La presencia de un halo naranja alrededor de las bacterias indicó una prueba positiva.

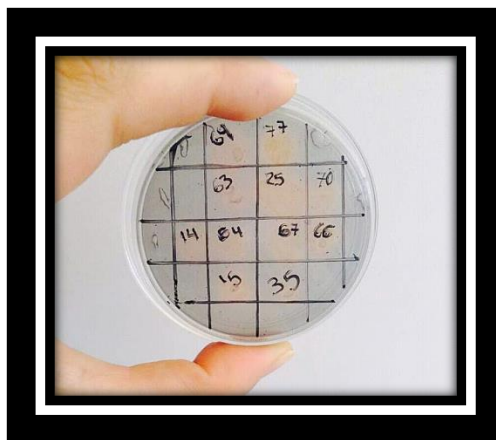


Figura 7. Prueba de siderofóros.

2.1.5 Aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa.

La actividad de ACC desaminasa de extracto libre de células se determinó por la medición de α -cetobutirato generado por la hidrólisis enzimática de ACC. Las bacterias se crecieron en caldo Luria Bertani a 30°C, 800 rpm durante 24 horas, posteriormente se centrifugaron a 9000 g por 10 minutos y se resuspendieron en caldo BPF hasta lograr una absorbancia 0.5 a 600nm. En 10 mL de caldo BPF se agregaron 100 μ l de la suspensión bacteriana, incubándose a 30°C, 800 rpm durante 24 h, y una vez transcurrido el tiempo se centrifugaron a 9000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Los pellets de las células se lavaron dos veces con 5 mL de buffer Tris-HCl 0.1M (pH 7.5), se resuspendieron en 1 mL de medio mínimo SM y posteriormente 0.5 mL de cada suspensión se adicionó a 2.5 mL de medio líquido SMN conteniendo 5 mM ACC como única fuente de nitrógeno. Las bacterias se incubaron por 24 h, 800 rpm a 30°C, se centrifugaron como se indicó anteriormente, fueron resuspendidas en 1 mL de buffer Tris-HCl 0.1M (pH 7.5), y se centrifugaron a 9000g por 10 minutos. Los pellets se resuspendieron en 600 μ l de buffer 0.1M pH (8.5) y las células fueron rotas por la adición de 30 μ l de tolueno. Después se realizó una mezcla de reacción conteniendo 100 μ l de la suspensión celular, 10 μ l de 0.5M ACC y 100 μ l de buffer TRIS-HCl (pH8.5)

incubándose a 30°C por 30 minutos, posteriormente 1 mL de HCl 0.56N fue adicionado y la mezcla se centrifugó a 14 000 g por 5 minutos. La mezcla sin contener suspensión celular o sin ACC se usaron como controles. Posteriormente 400 µl de HCl 0.56 N y 150 µl de 0.2% de 2,4 dinitrofenilhidrazina en HCl 2N fue adicionado a 500µl del sobrenadante. La mezcla se hizo reaccionar por 30 minutos a 30°C suplementada con 1 mL de NaOH 2N y ensayado para α-cetoglutarato vía la determinación de la densidad óptica a 540 nm.



Figura 8. Espectrofotómetro UV- Visible.

2.1.6 Ácido Indol Acético (AIA)

Las cepas bacterianas a probar se crecieron en caldo Luria Bertani a 30°C, 800 rpm durante 24, estas fueron separadas por centrifugación a 11 000 rpm durante 10 minutos, y resuspendidas en solución fisiológica hasta alcanzar una absorbancia de 0.5 a 600 nm, para obtener aproximadamente 1×10^9 bacterias ml^{-1} .

De la suspensión se agregaron 100 μL a 5 mL de medio conteniendo 28 g NaCl, 5.0 g NH_4Cl , Na_2MoO_4 0.01g, CaCl_2 400 μM , FeCl_3 50 μM , $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1 mg, H_3BO_3 10 μg , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 11 μg , $\text{Zn SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 125 μg , KH_2PO_4 1.36 g, Na_2HPO_4 2.13 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, glucosa 10 g, L-triptofano 0.5 g, extracto de levadura 0.1 g para 1L, incubándose a 30°C a 80 rpm durante 24 h. Después de la incubación la bacterias se separaron por centrifugación a 11 000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente 1 mL del sobrenadante fue transferido a un tubo y mezclado con 2 mL del reactivo de Salkovski y mantenido a temperatura ambiente durante 30 minutos; después de este tiempo una coloración rosa se desarrolló en la mezcla. La absorbancia fue medida a 530 nm. La concentración de AIA fue determinada usando una curva de calibración de AIA puro como estándar.



Figura 9. Coloración en la prueba de AIA.

2.2 Diseño experimental.

El experimento se ubicó en la parte media de la plantación de la cual se tomaron 240 arbustos de blueberry seleccionados al azar. Se realizaron 24 tratamientos (T1-T23 inoculado con las cepas bacterianas seleccionadas y el T24 como testigo el cual solo se le colocó buffer de fosfatos 0.1M pH 7.4); para cada tratamiento se tomaron 10 arbustos.

Se hizo una medición de la longitud de la rama principal de cada arbusto, el número de ramas, hojas y flores antes de la primera inoculación y 10 semanas después de ésta.

Las variables que se cuantificaron en este experimento fueron la concentración de macro (K, P, Na) y micro nutrientes (Cu, Zn, Fe, Mn) tanto en hojas como en frutos, antocianinas en los frutos y clorofila a, b y total en las hojas.

2.2.1 Preparación del inoculo.

Se sembraron las 11 cepas que fueron aisladas de plantaciones de blueberry y 12 aisladas de cultivos de vainilla, previamente identificadas como *Scherichia* (N16), *Citrobacter* (M54C1), *citrobacter* (N60C1), *Enterobacter* (N53C1), *Enterobacter* (N54C1), *Serratia* (MC119), *Serratia* (MC107), *Lysinibacillus* (MC118), *lisinybacillus* (N2C1), *Enterobacter* (N9), *Enterobacter* (MC156), *Enterobacter* (K131), en tubos con 5 mL de caldo rojo de fenol y sacarosa (Figura 11), se dejaron en incubación a 30 °C durante 24 h en agitación a 80 rpm, posteriormente se sembraron en matraces con 50 mL de caldo rojo de fenol y sacarosa y se incubaron durante 24 h a 30°C a 80 rpm (figura 10) para su posterior separación mediante centrifugación a 8000 rpm durante 10 minutos (Figura12), la biomasa se resuspendió en buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.4, y se hizo un ajuste a 0.5 A a 600nm lo que corresponde aproximadamente a $1 * 10^9$ bacterias mL⁻¹.



Figura 10. Preparación de los inóculos.



Figura 11. Preparación de medio rojo.



Figura 12. Centrifugación

2.3 Etapas del trabajo en campo.

2.3.1 Inoculación en campo.

Se realizó la inoculación en la plantación seleccionada durante el periodo de floración de los arbustos (Figura 13).

Se inoculó cada arbusto con 100 mL de la suspensión bacteriana alrededor de la base del tallo (Figura 14), 10 repeticiones por cada cepa y un control que fue inoculado únicamente con buffer de fosfatos de acuerdo con el diseño experimental ya mencionado.

Se llevaron a cabo dos inoculaciones, una durante el periodo de floración de los arbustos, y la otra durante el periodo de maduración de la fruta.



Figura 13. Trabajo en campo.



Figura 14. Inoculación en campo.

2.3.2 Muestreo.

Después de la etapa de maduración de la fruta se tomaron muestras de fruta y hojas de cada grupo de arbustos respectivamente para su análisis en el laboratorio. Se tomaron muestras de cada arbusto y se almacenaron en refrigeración hasta su utilización.



Figura 15. Arbustos muestreados.

2.3.4 Determinación de clorofilas a, b y totales.

Se pesaron 0.5 gr de hojas de cada grupo de muestras, se colocaron en frascos de 30 mL con 10 mL de acetona al 80% y se almacenaron en oscuridad a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas, pasado este tiempo, cada muestra se vertió en un mortero de Ágata y utilizando arena de mar se trituraron hasta formar una pasta homogénea (figura 14), posteriormente se filtraron y se aforaron a 10 mL con acetona al 80% (figura 15).

Se leyeron las absorbancias en el espectrofotómetro UV – Visible en las longitudes de onda 662, 645 y 652 nm para clorofila a, b y total respectivamente. Para el blanco de muestra se utilizó acetona al 80%.

$$\text{Clorofila a} = 11.75A_{662} - 2.35A_{645}$$

$$\text{Clorofila b} = 18.61A_{645} - 3.960AA_{662}$$

$$\text{Clorofila total} = 27.8 A_{652}$$

En donde:

A_{662} = Absorbancia a una longitud de onda 662 nm.

A_{645} = Absorbancia a una longitud de onda 645 nm.

A_{652} = Absorbancia a una longitud de onda 652 nm.



Figura 16. Trituración de la muestra.

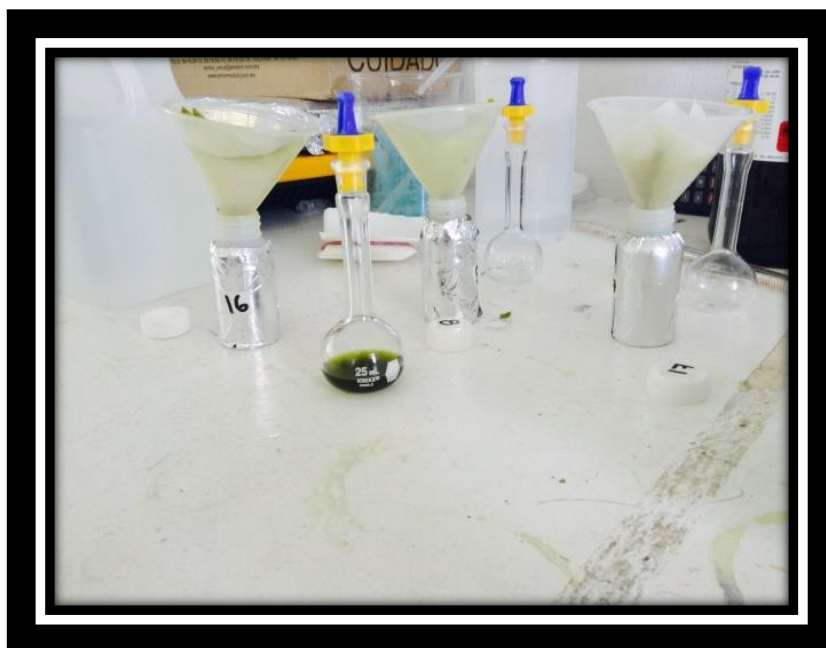


Figura 17. Filtración y aforo.

2.3.5 Determinación de antocianinas.

Para la determinación de antocianinas en las frutas se prepararon dos soluciones con diferente pH, para la primera con pH 1 (cloruro de potasio) se pesó 1.86 g de KCl, adicionando 980 mL de agua, el pH se ajustó a 1.0 (± 0.05) con HCl y posteriormente se aforó a 1 L, y para la segunda con pH 4.5 (acetato de sodio), se pesó 54.43 g de acetato de sodio y se adicionó agua destilada hasta 960 mL, se realizó en ajuste de pH a 4.5 (± 0.05) con HCl y se aforó a 1 L. Posteriormente se realizaron las diluciones con 1 mL de néctar de las frutas de cada grupo y 4 mL de cada buffer respectivamente, es decir con proporción 1:4, después se leyeron las absorbancias a 520 nm y 700nm.

$$\frac{A * MW * DF * 10^3}{\epsilon * l}$$

Dónde:

$$A = (A_{520nm} - A_{700nm}) \text{ pH } 1.0 - (A_{520nm} - A_{700nm}) \text{ pH } 4.5$$

MW (peso molecular) = 449.2 g/mol (cyd-3-glu)

DF = Factor de dilución 1:4

l = trayecto en cm^3

ϵ = 26 900 coeficiente de extinción molar en $\text{L} * \text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ para cyd

10^3 = factor de conversión de g a mg.

2.3.6 Cuantificación de macro y micro nutrientes en hojas y frutas.

Para la cuantificación de macro y micro nutrientes en hojas y frutas se secaron las muestras en la estufa a 50° C durante 12 h y se trituraron en un mortero hasta obtener un polvo fino, se pesó cada muestra según su grupo hasta obtener 0.5 g de cada una y se agregaron 1 mL de peróxido de hidrogeno, 1mL de ácido clorhídrico y 5 mL de ácido nítrico por cada muestra.

La solución fue colocada en el microondas de digestión acida a 180°C durante 30 minutos, posteriormente se filtraron y se aforaron a 25 mL con agua destilada, se almacenaron en frascos de 30 mL y se tuvieron en refrigeración para posteriormente realizar la cuantificación de los elementos Cu, Zn, Fe, Na, Mn, P y K con el espectrofotómetro de absorción atómica.

Para los elementos K y P se realizó una dilución 1:10 de las muestras, debido al alto contenido de estos en hojas y frutas, esto para facilitar el análisis de las concentraciones.

CAPITULO III

Resultados.

El uso de PGPB y el impacto que los microorganismos tienen en los arbustos de blueberry se ha ido estudiando a lo largo de este trabajo. El análisis de los resultados se muestra a continuación.

3.1 Mediciones de longitud, diámetro del tallo, hojas, ramas y flores.

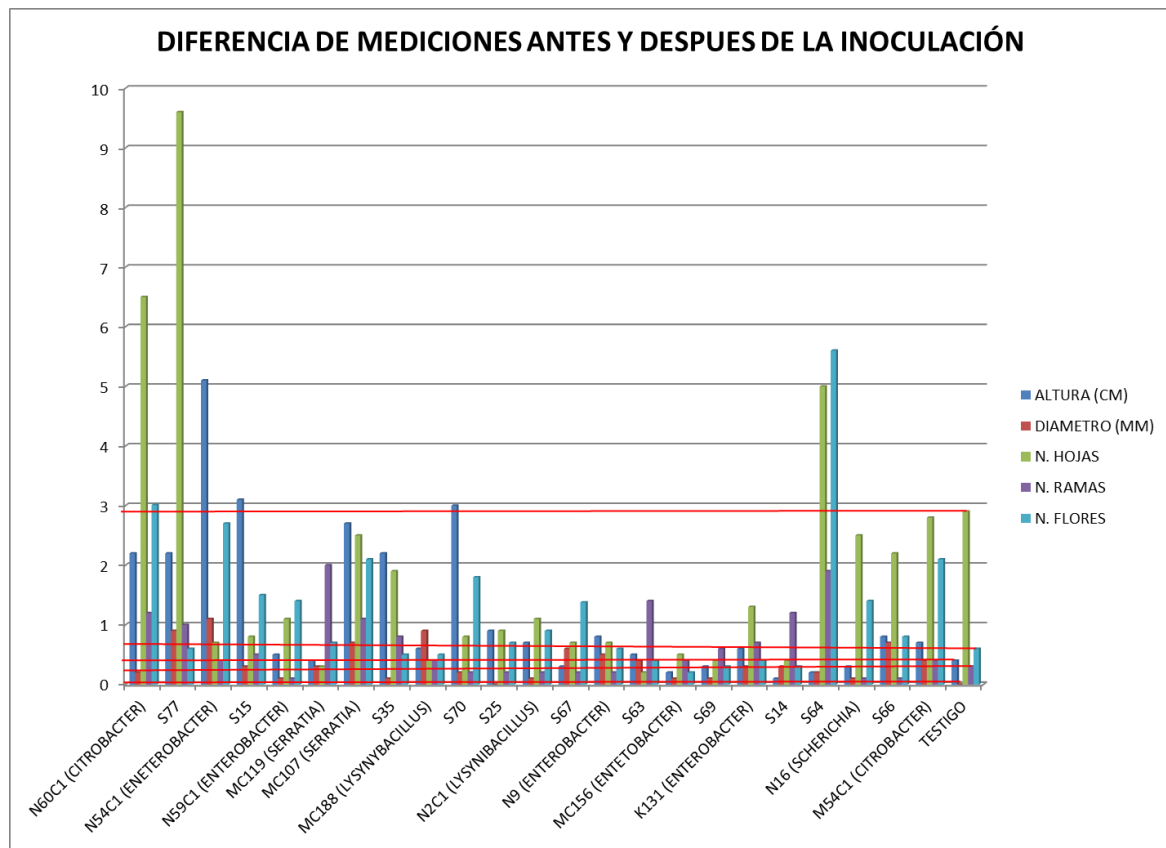


Figura 18, Diferencia de mediciones en las 2 inoculaciones.

En el análisis de la altura la cepa N54C1 (*Enterobacter*) presentó el aumento mayor seguida de la cepa S66, S15, S70, MC107 (*Serratia*), N60C1 (*Citrobacter*), S35, S25, N9 (*Eterobacter*), K131 (*Enterobacter*), las demás no mostraron diferencia con respecto al testigo.

Con respecto a la medición del diámetro de la rama principal, la cepa que aumento más fue N54C1 (*Enterobacter*), Seguida de S77, MC188 (*Lysinibacillus*), S66, MC107 (*Serratia*), S67, N9 (*Enterobacter*), S63, M54C1 (*Citrobacter*), S70, MC119 (*Serratia*), S15, N60C1 (*Citrobacter*), N59C1 (*Enterobacter*), S35, N2C1 (*Lysinibacillus*) MC165 (*Enterobacter*), S69, S14, S64, N16 (*Scherichia*) y S25, El testigo está por debajo de todas las cepas utilizadas.

En el análisis de crecimiento de ramas se observó que las cepas con mayor crecimiento fueron MC119 (*Serratia*) y S65 seguidas por S63, S14, N60C1 (*Citrobacter*), S77, MC107 (*Serratia*), S63, S35, K131 (*Enterobacter*), S69, y S15, las demás no mostraron diferencia con respecto al testigo. (Figura 16)

El análisis del número de hojas indica que las únicas cepas que mostraron un aumento fueron la cepa S77, seguida de N60C1 (*Citrobacter*), y finalmente S64, las demás cepas no mostraron diferencias con respecto al testigo (Figura 16).

La cepa S64 tuvo un mayor aumento en el número de flores seguida de N60C1 (*Citrobacter*), N54C1 (*Enterobacter*), M54C1 (*Citrobacter*), N16 (*Scherichia*), S70, MC107 (*Serratia*), N59C1 (*Enterobacter*) y S67, las demás cepas no mostraron diferencias frente al testigo. (Figura 16)

3.2 Concentración de AIA.

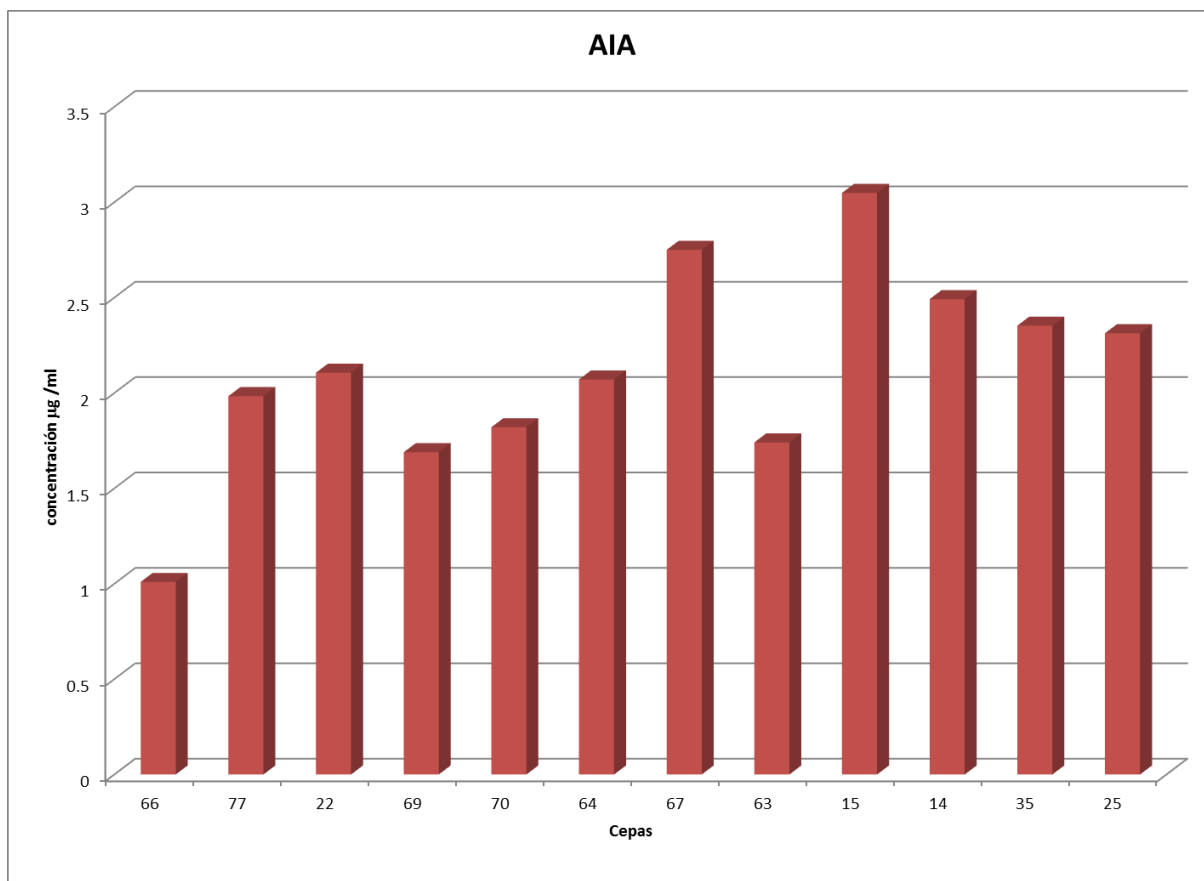


Figura 19. Concentraciones de Ácido Indol Acético (AIA) en las cepas aisladas de plantaciones de blueberry.

En el análisis de producción de AIA en las bacterias aisladas de plantaciones de blueberry observamos que la cepa 15 tuvo una mayor producción, seguida de la cepa 67 y 14, las cepas 35 y 25 tuvieron una producción muy similar, seguidas de 22, 64 y 77, las cepas 63, 70 y 69 las siguen y por último la cepa 66 que fue la que tuvo una menor producción. (Figura 19)

3.3 Concentración de ACC Desaminasa.

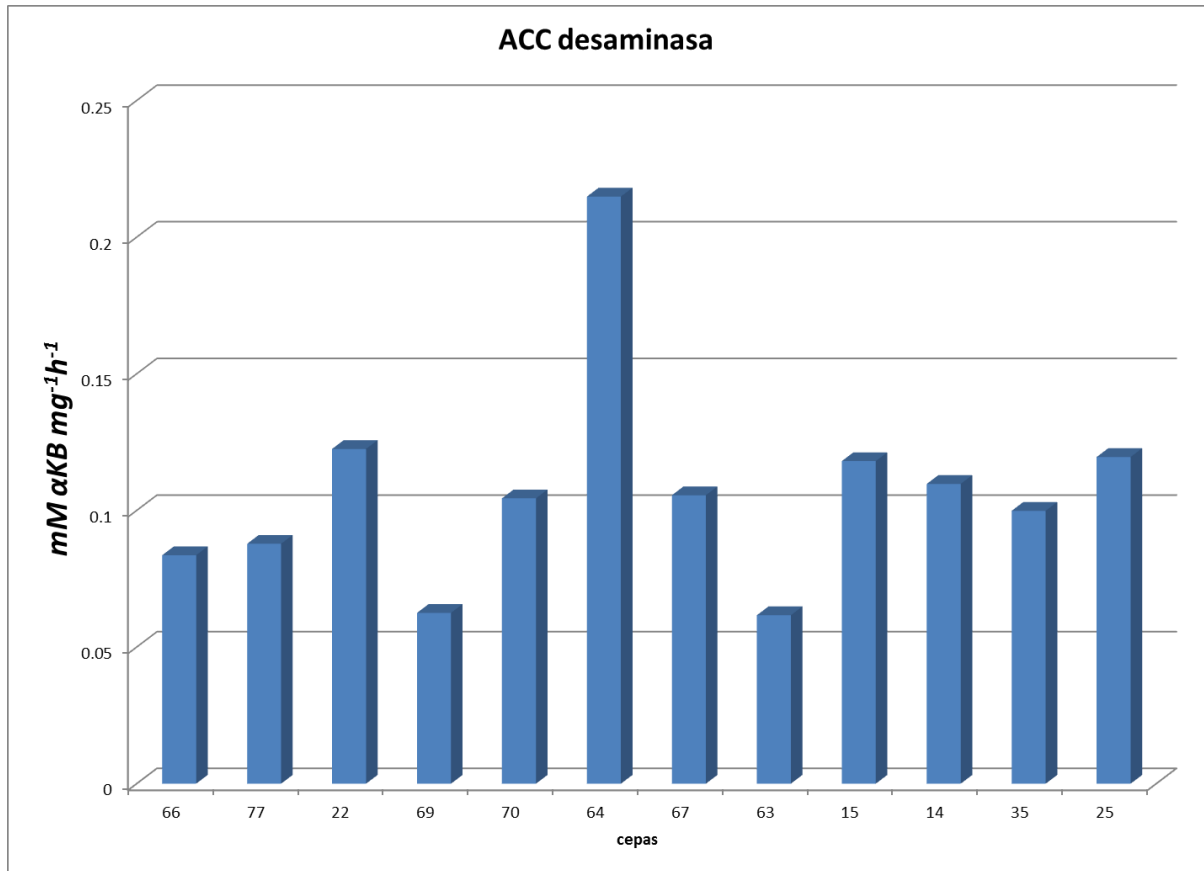


Figura 20. Concentraciones de α -cetobutirato en las cepas aisladas en plantaciones de blueberry (prueba de ACC Desaminasa)

El gráfico anterior (Fig. 20) muestra la concentración de α -cetobutirato que presentaron las bacterias aisladas del suelo de blueberry, como podemos observar la cepa 64 presentó una mayor concentración respecto a las demás, seguida de las cepas 22, 14, 15 y 25, que están por encima de las cepas 66, 77, y 35. Sin embargo las cepas 69 y 63 presentaron una concentración muy por debajo de las demás. Por lo que podemos decir que las cepas 64, 22, 14, 15 y 25 tuvieron una mayor producción de la enzima ACC Desaminasa.

3.4 Cuantificación de clorofilas en las hojas y plantas

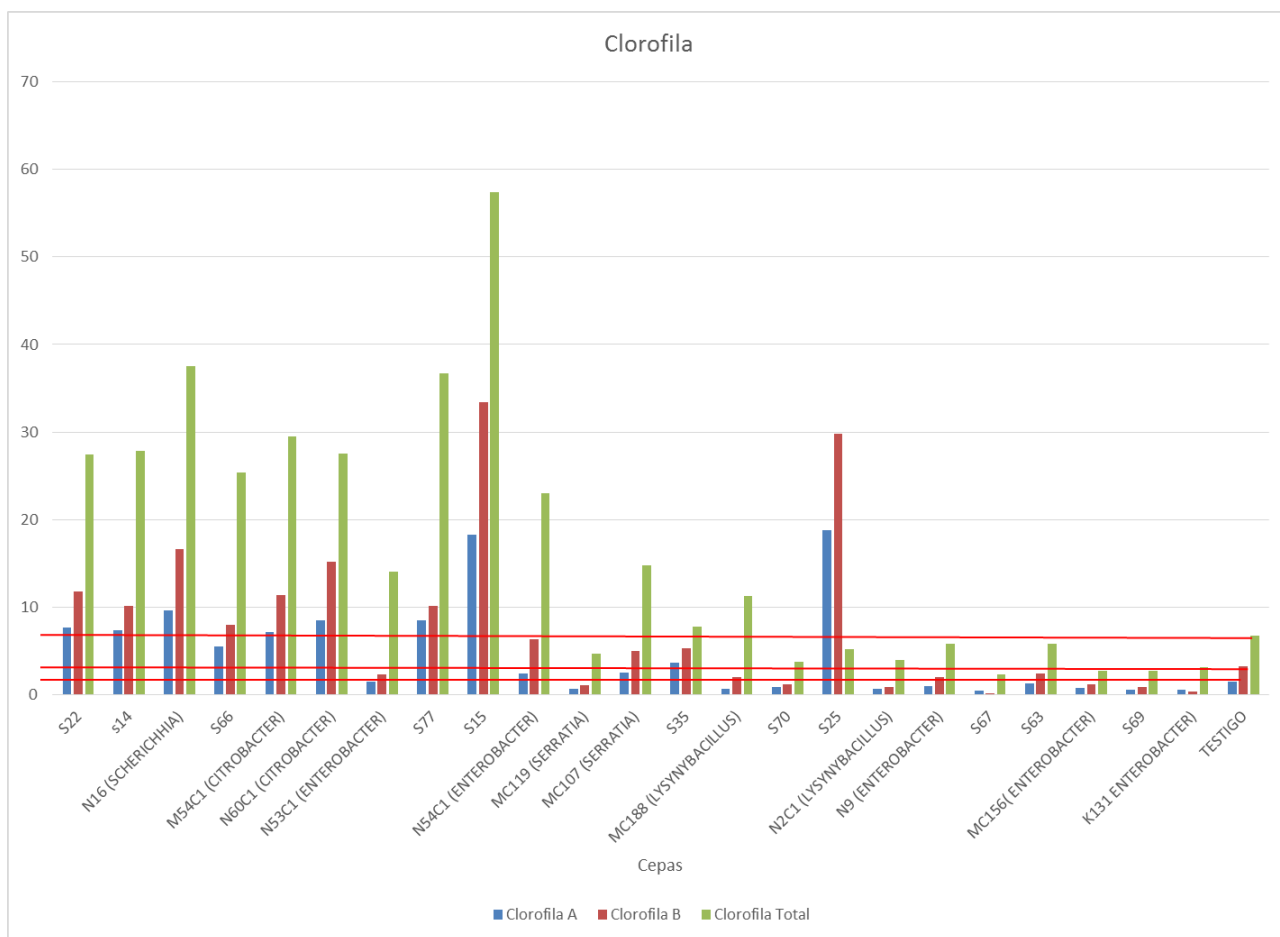


Figura 21. Concentración de clorofilas a, b y totales en los grupos de arbustos inoculados con PGPB.

El análisis de la concentración de clorofilas A, B y totales (Figura 21) en las hojas de los arbustos inoculados, podemos observar que las cepas N9 (Enterobacter), 77 y 14 presentan diferencias significativas $p < 0.05$ en los tres tipos de clorofila con respecto al testigo, mientras que en el resto los valores son más elevados pero sin diferencias significativas.

3.5 Cuantificación de antocianinas en frutas.

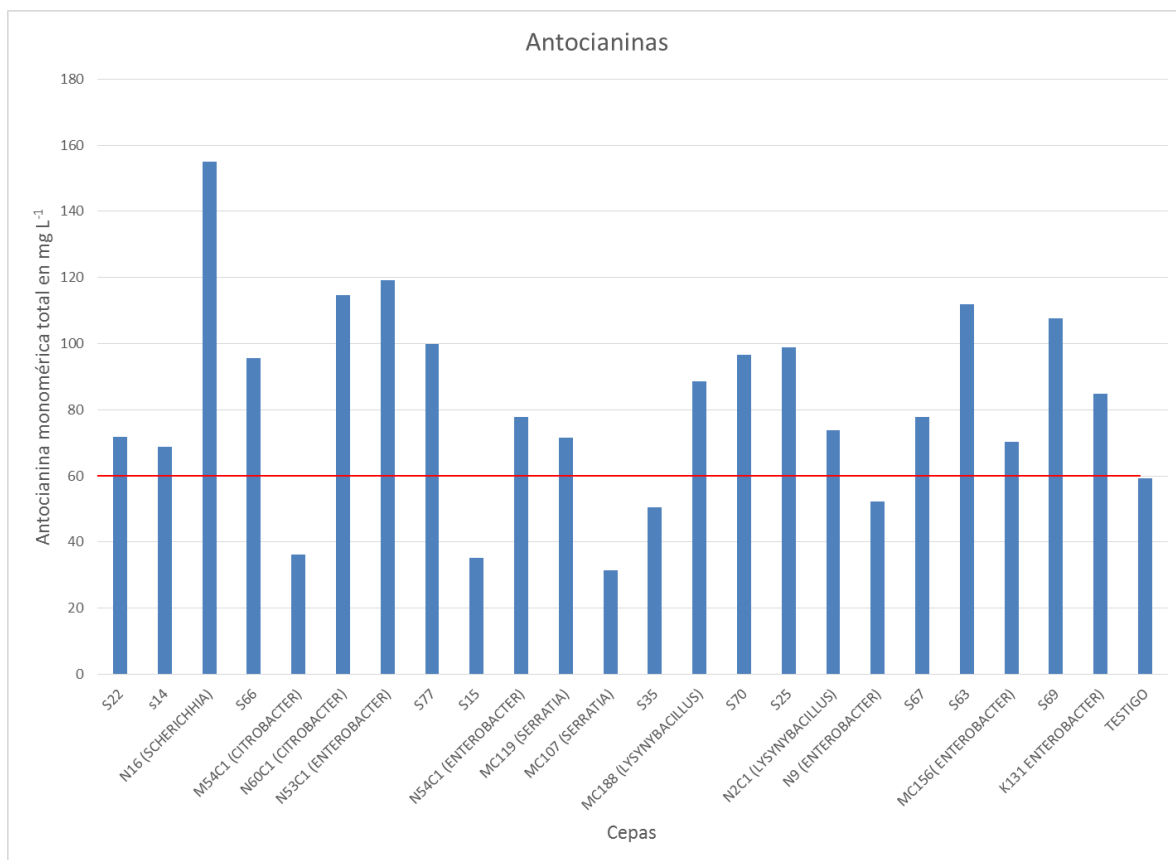


Figura 22. Concentración de antocianinas presentes en los frutos de los grupos de arbustos de blueberry inoculados.

El estudio de la concentración de antocianinas muestra que las cepas que tuvieron una concentración con diferencias significativas $p < 0.05$ fueron N16 (*Escherichia*), N60C1 (*Citrobacter*), 14, 77, 70, 67, 69, MC118 (*Lysinibacillus*), cepas MC156 (*Enterobacter*), MC54C1 (*Citrobacter*) y K131 (*Enterobacter*) las demás cepas no mostraron diferencias con respecto al testigo. (Figura 22).

3.6 Concentración de Cu.

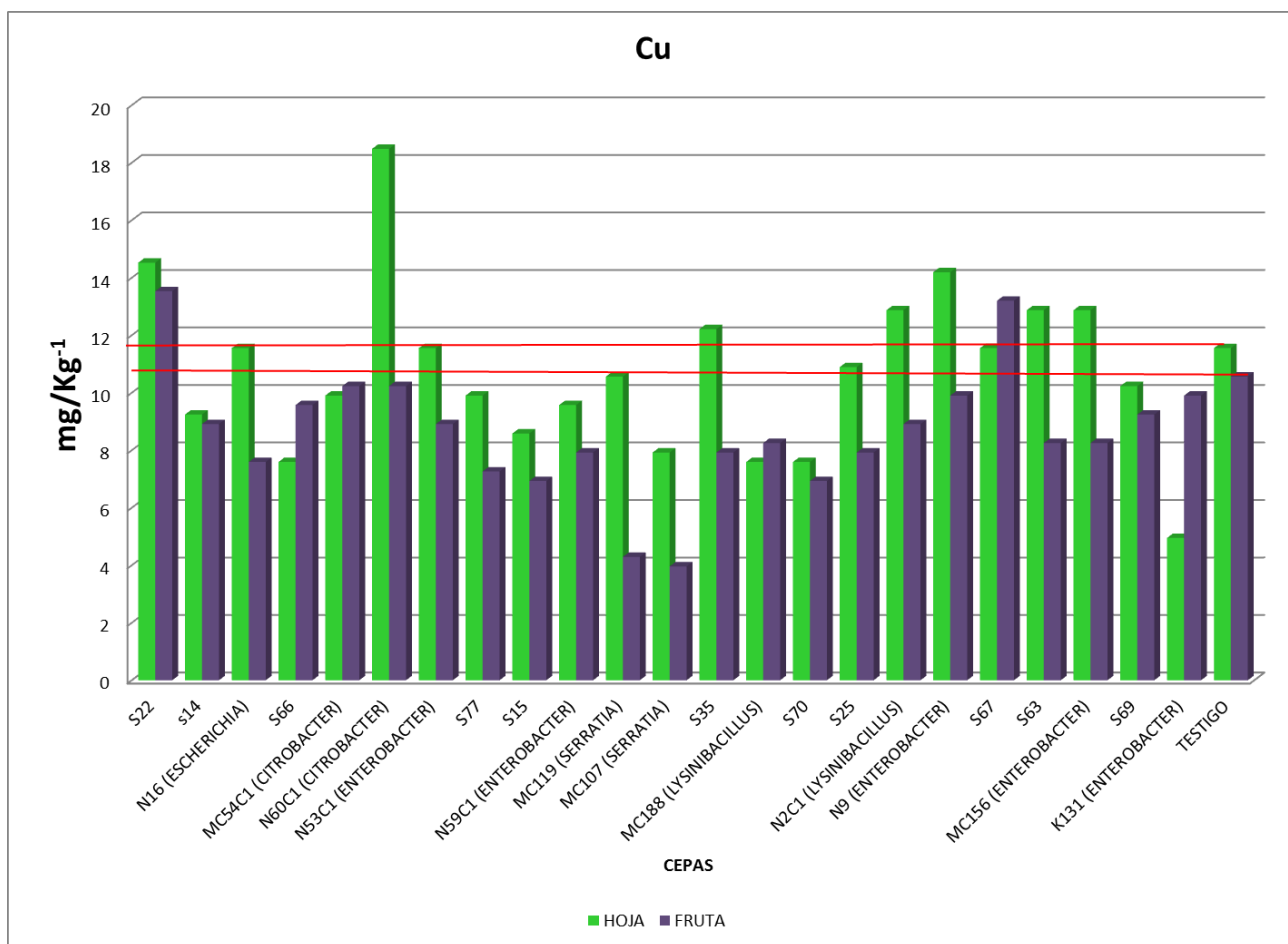


Fig. 23. Concentraciones de Cu en hojas y frutas de los grupos de arbustos de blueberry inoculados con PGPB.

Las concentraciones de Cu registradas en hojas y frutas, muestran que las cepas con concentraciones significativas mayores a $p < 0.05$ fueron 22, 67, N60C1 (*Citrobacter*) para hojas y 22, 67 para los frutos, las cepas restantes no mostraron diferencia con el testigo (Figura 23)

3.7 concentración de Zn

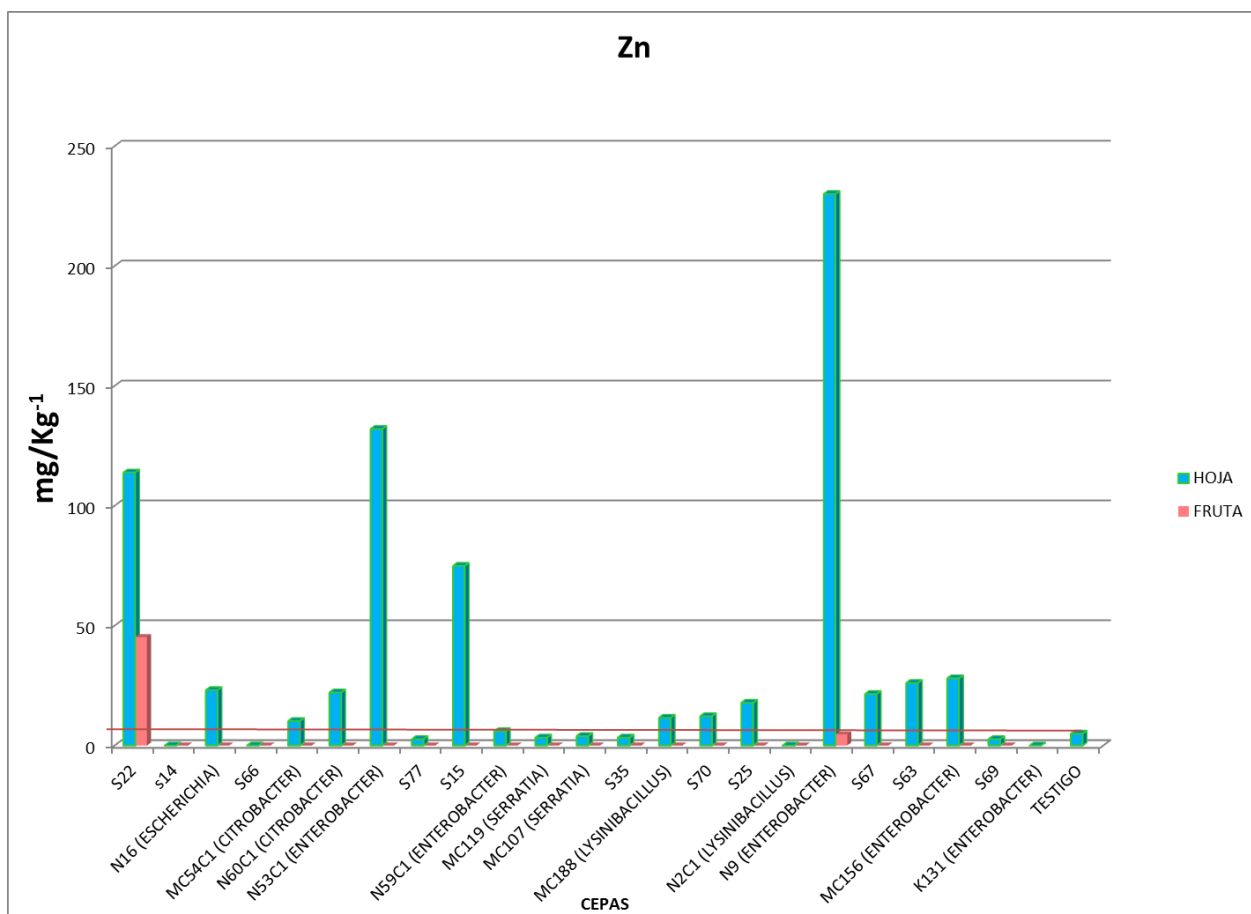


Figura 24. Concentraciones de Zn en hojas y frutas de los grupos de arbustos de blueberry inoculados con PGPB.

En la cuantificación de las concentraciones de Zn registradas las cepas 22, 66, 77, 15, 70, 25, 67, 73, N53C1 (*Enterobacter*), MC156 (*Enterobacter*), N9 (*Enterobacter*) y N2C1 (*Lysinibacillus*) en hojas y 22, junto con N9 (*Enterobacter*) en frutas presentaron concentración mayor $p < 0.05$, las demás cepas no registraron diferencias con respecto al testigo. (Figura 24)

3.8 Concentración de Fe.

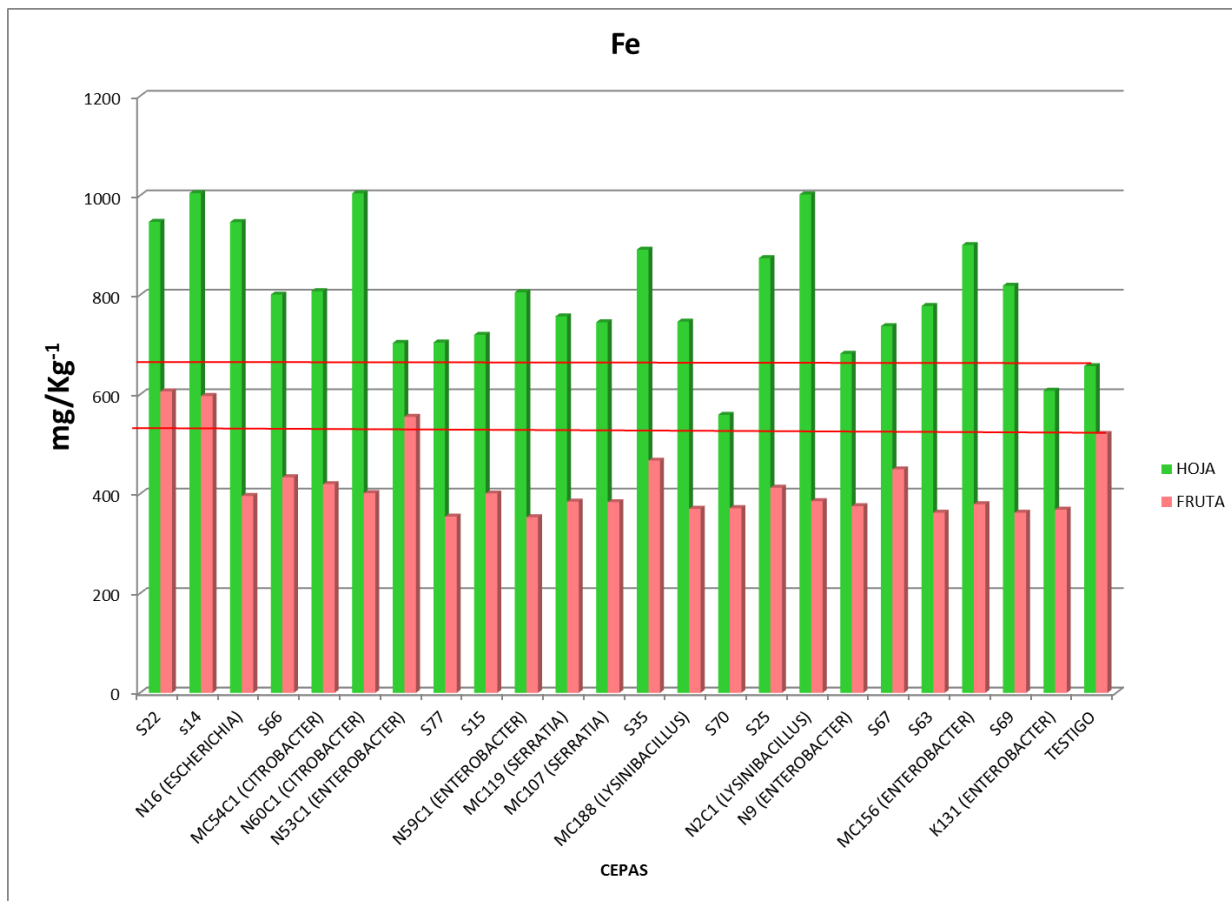


Figura 25. Concentraciones de Fe en hojas y frutas de los grupos de arbustos de blueberry inoculados con PGPB.

Las concentraciones de Fe registradas muestran que algunas cepas presentaron concentraciones por arriba del testigo, sin embargo ninguna cepa mostró diferencias significativas en hojas y frutas con respecto al testigo (Figura 25)

3.9 Concentración de Na.

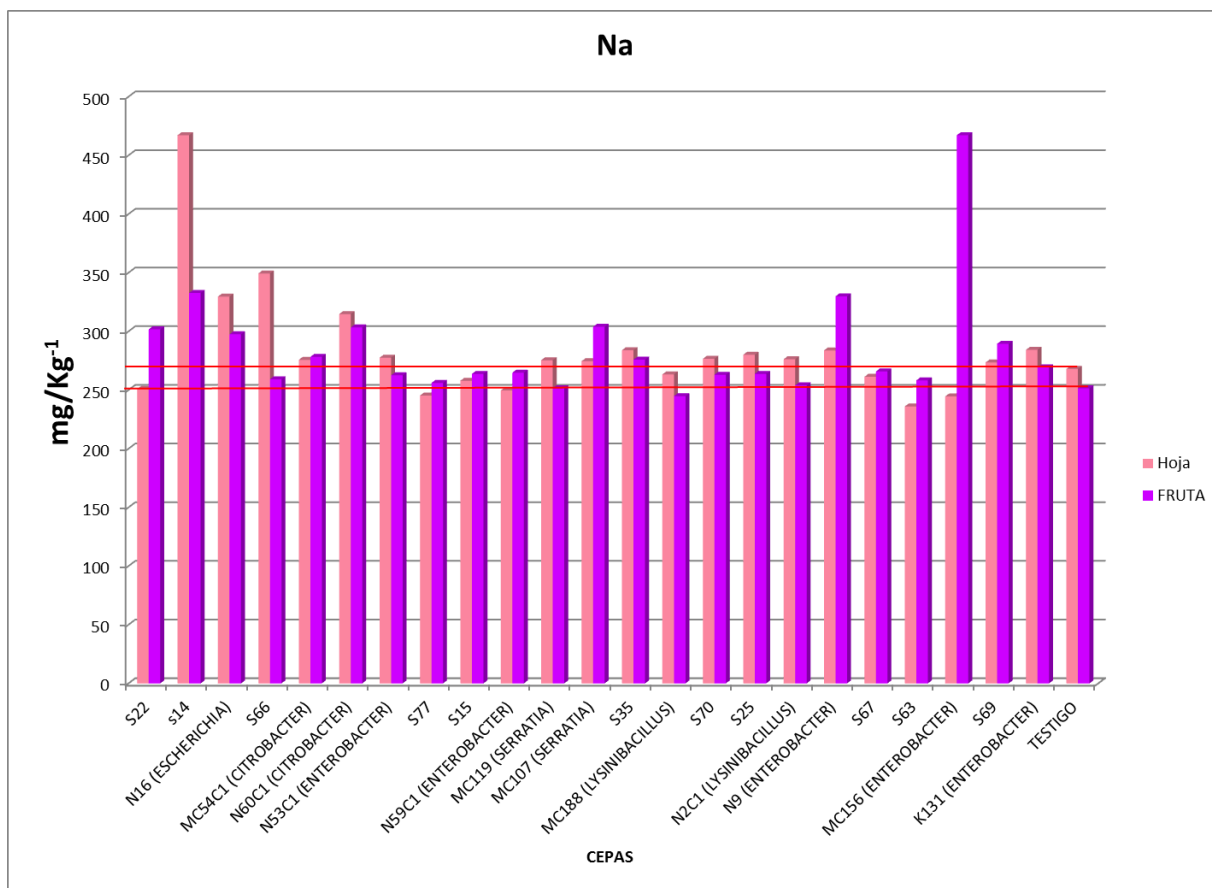


Figura 26. Concentraciones de Na en hojas y frutas de los grupos de arbustos de blueberry inoculados con PGPB.

En el estudio la concentraciones de Na la mayoría de las cepas presentaron diferencias significativas con respecto al testigo tanto en hojas como en frutas, sin embargo las que no lo tuvieron fueron las cepas 22, 15, N59C1 (*Enterobacter*), N53C1 (*Enterobacter*) y MC119 (*Serratia*). (Figura 26)

3.10 Concentración de Mn.

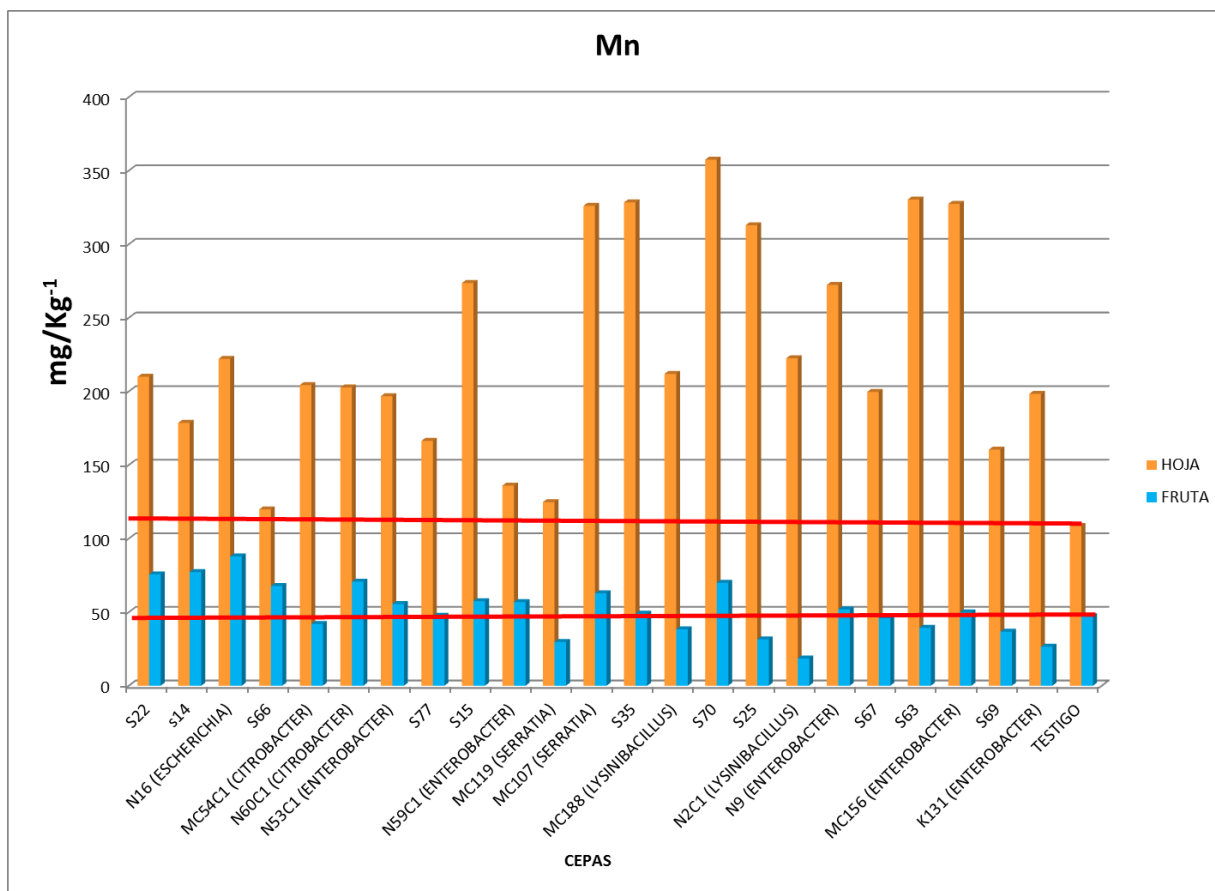


Fig. 27. Concentraciones de Mn en hojas y frutas de los grupos de arbustos de blueberry inoculados con PGPB.

El estudio de las concentraciones de Mn que todas las cepas tuvieron una diferencia significativa $p < 0.05$ en la concentración tanto en hojas como en frutas con respecto al testigo (Figura 27)

3.11 Concentración de P.

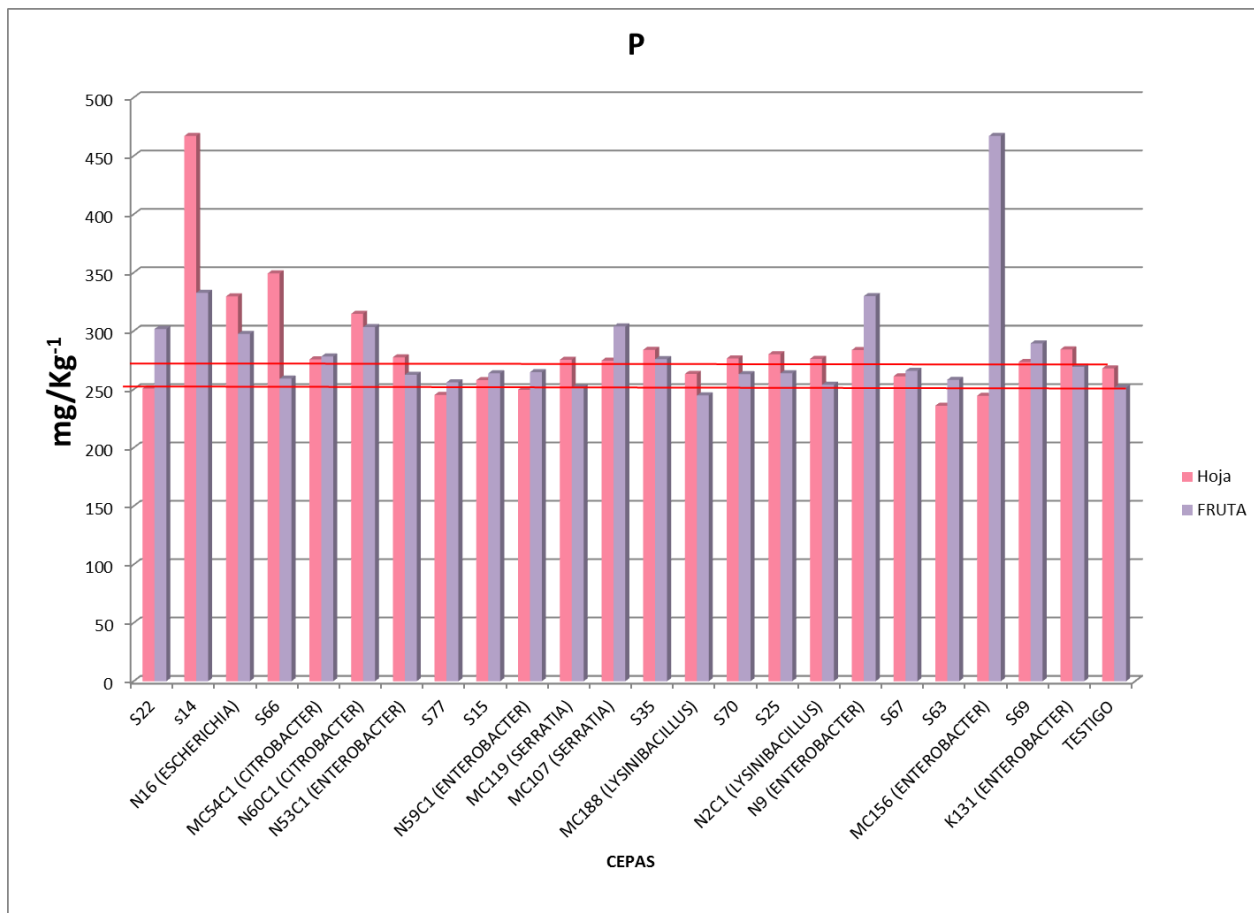


Fig. 28. Concentraciones de P en hojas y frutas de los grupos de arbustos de blueberry inoculados con PGPB.

En el análisis de la concentración de P las cepas que presentaron una mayor concentración fueron 14, 66, N60C1 (*Citrobacter*) y N9 (*Enterobacter*) en hojas y N60C1 (*Citrobacter*), MC156 (*Enterobacter*), 22, 14 y N16 (*Scherichia*) en frutas con concentraciones $p < 0.05$, las demás cepas no presentan diferencias significativas por encima del testigo. (Figura 28)

3.12 Concentración de K.

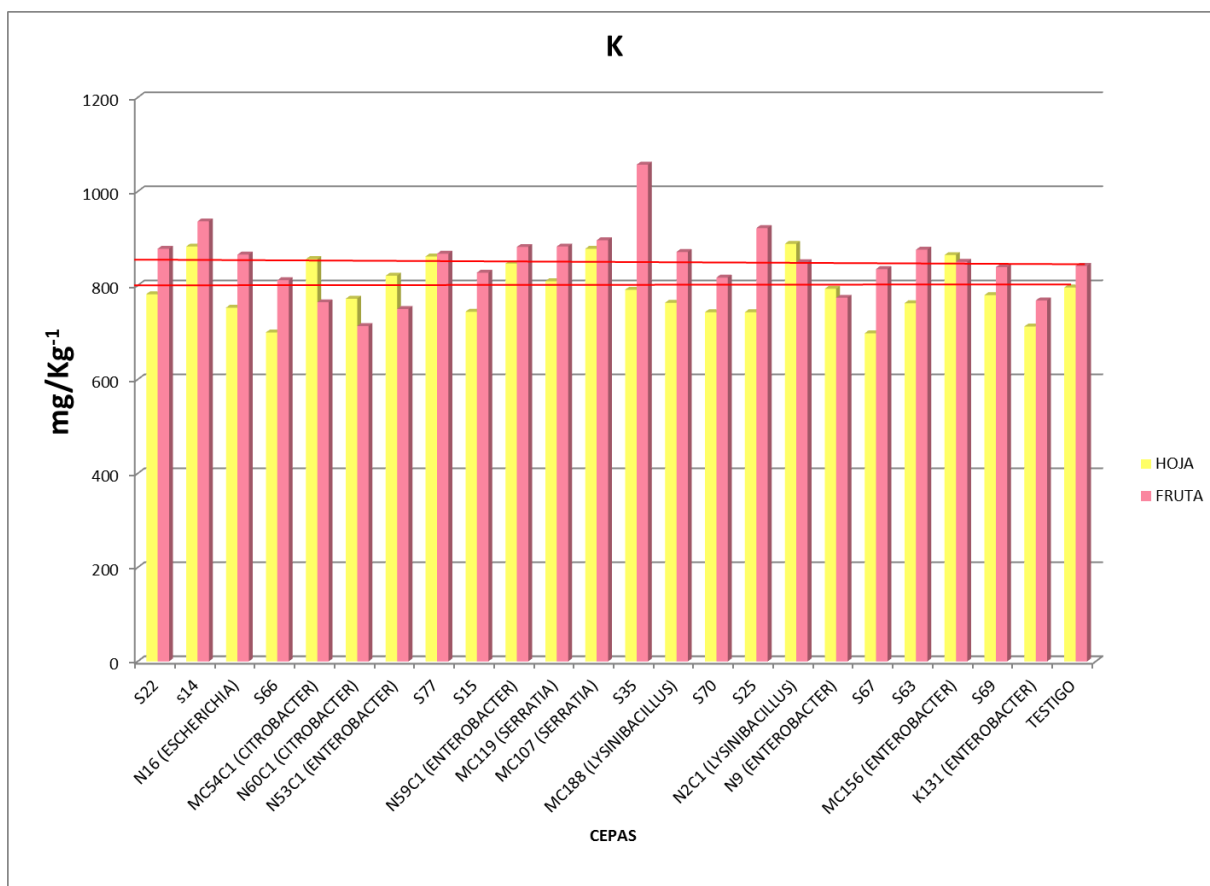


Figura 29. Concentraciones de K en hojas y frutas de los grupos de arbustos de blueberry inoculados con PGPB.

En la determinación de la concentración de K las cepas con diferencias $p < 0.05$ fueron 22, 14, 35, 25, en fruta y N59C1 (*Enterobacter*), N53C1C1 (*Enterobacter*), M54C1 (*Citrobacter*), K131 (*Enterobacter*) y MC156 (*Serratia*) en hojas, las demás cepas no presentan diferencias significativas respecto al testigo (Figura 29).

CONCLUSIONES

- La inoculación en campo con PGPB tuvo un efecto positivo en el crecimiento del tallo, del diámetro, el aumento el número de hojas, flores y ramas en los arbustos inoculados en comparación con el testigo.
- De acuerdo al estudio realizado las cepas con mayor impacto en el crecimiento de los arbustos de blueberry son 14,77, 70, N9 (*Enterobacter*) y M54C1 (*Citrobacter*), ya que presentaron diferencias significativas $p < 0.05$ en las concentraciones de Cu, Zn, Mn, Na, P, y K con respecto al testigo que no fue inoculado.
- El uso de las cepas 14, 77, 70 N9 (*Enterobacter*) y M54C1 (*Citrobacter*) como Bacterias Promotoras del Crecimiento en plantaciones de blueberry es una alternativa viable para el mejoramiento de la producción y la calidad de los frutos ya que aumenta la concentración de antioxidantes presentes el el fruto de forma significativa con respecto a los no inoculados.

BIBLIOGRAFÍA.

Arshad, M. y W.T. Frankenberger Jr. 1991. Microbial production of plant hormones. *Plant Soil* 133: 1–8. Arshad, M. y W.T. Frankenberger Jr. 1998. Plant growthregulating substances in the rhizosphere: Microbial production and functions. *Adv. Agron.* 62: 45-151.

Arshad, M. y W.T. Frankenberger Jr. 1998. Plant growthregulating substances in the rhizosphere: Microbial production and functions. *Adv. Agron.* 62: 45-151.

Barea, J.M. y C. Azcón-Aguilar. 1982. La Rizosfera: Interacciones microbio-planta. *Anales de Edafología y Agrobiología XII (7-8): 1517-1532.*

Bashan, Y. y H. Levanony. 1991. Alterations in membrane potential and in proton efflux in plant roots induced by *Azospirillum brasilense*. *Plant Soil* 137: 99-103.

Bashan, Y., G. Holguín y R. Ferrera-Cerrato. 1996a. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. I. *Azospirillum*. *Terra* 14: 159-194.

Beauchamp, Ch.J., P. Dion, J.W. Kloepper y H. Antoun. 1991. Physiological characterization of opine-utilizing rhizobacteria for traits related to plant growth-promoting activity. *Plant Soil* 132: 273-279.

Boonjawat, J., P. Chaisiri, J. Limpananont, S. Soontaros, P. Pongsawasdi, S. Chaopongpang, S. Pornpatkul, B. Wongwaitayakul y L. Sangduan. 1991. Biology of nitrogen-fixing rhizobacteria. *Plant Soil* 137: 119-125.

Bowen, G.D. y A.D. Rovira. 1999. The Rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv. Agron.* 66: 1-102.

Brown, M.E. 1972. Plant growth substances produced by microorganisms in soil and rhizosphere. *J. Applied Bacteriology* 35: 443-451.

Carlson, N. 1983. Siembra de Mirtillo en México, Archivo Municipal, Zacatlán Puebla.

Chalk, P.M. 1991. The contribution of associative and symbiotic nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of non-legumes. *Plant Soil* 132: 29-39.

Cheng, W. 1999. Rhizosphere feedback in elevated CO₂. *Tree Physiol.* 19: 313-320.

Crowley, D.E., C.P.P. Reid y P.J. Szaniszlo. 1988. Utilization of microbial siderophores in iron acquisition by oat. *Plant Physiol.* 87: 680-685.

Crowley, D.E., Y.C. Wang, C.P.P. Reid y P.J. Szaniszlo. 1991. Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant Soil* 130: 179-198.

Dirección de Desarrollo Rural del Municipio de Zacatlán, Reunión con la asociación de Productores de Zacatlán Mayo 2015.

Döbereiner, J., S. Urquiaga, R.M. Boddey y N. Ahmad. 1995. Alternatives for nitrogen of crops in tropical agriculture. Nitrogen economy in tropical soil. *Fertil. Res.* 42: 339-346.

Dobbelaere S., Croonenborghs A., Thys A., Broek A.V., Vanderleyden J. (1999): Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil*, 212: 155–164.

Echegaray-Alemán, A. 1995. El ciclo del nitrógeno y fases que lo constituyen. pp. 7-35. In: Ferrera-Cerrato, R. y J. Pérez M. (eds.). *Agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable*. Colegio de Postgraduados. Montecillo, estado de México.

Elmerich, C., W. Zimmer y C. Vieille. 1992. Associative nitrogen fixing bacteria. pp. 212-258. In: Stacey, G., R.H. Burris y H.J. Evans (eds.). Biological nitrogen fixation. Chapman and Hall. New York

Galicia J. M., Sandoval C.C., Rojas H. R., Magaña S. H. 2011. Bacterial chemotaxis and flavonoids: prospects for the use of probiotics. Tropical and subtropical agroecosystems vol.14 no.3 Mérida

Glick B.R., Patten C.L., Holguin G., Penrose D.M., 1999. Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria. Imperial College Press, London, UK.

Hatzinger, P.B. y M. Alexander. 1994. Relationships between the number of bacteria added to soil or seeds and their abundance and distribution in the rhizosphere of alfalfa. Plant Soil 158: 211-222.

Herman, R.P., K.R. Provencio, R.J. Torrez y G.M.Seager. 1994. Seasonal and spatial population dynamics of the nitrogeefficient guild in a desert bajada grassland. Applied Environ. Microbiol. 60: 1160-1165

IBO, Summit 2014, Guadalajara Jalisco, México, 10, 11 y 12 de Marzo. [En línea] 2014, [Fecha de consulta: Marzo 2016]. Disponible en <<http://www.internationalblueberry.org>>

INEGI, Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos Zacatlán, Puebla. Clave geoestadística 21208 [En línea] 2009, [fecha de consulta: febrero 2016]. Disponible en: <<http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/datos-geograficos/21/21208.pdf>>

Jones, D.L., P.R. Darrah y L.V. Kochian. 1996. Critical evaluation of organic acid mediated iron dissolution in the rhizosphere and its potential role in root iron uptake. Plant Soil 180: 57-66.

- Loper, J.E., C. Haack y M.N. Schoth. 1985. Population dynamics of soil pseudomonads in the rhizosphere of potato. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 416-422
- Mandinba, G., T. Heulin, R. Bally, A. Guckert y J. Balandreau. 1986. Chemotaxis of free-living nitrogen-fixing bacteria towards maize mucilage. *Plant Soil* 90: 129-139.
- Martínez-Toledo, M.V., T. de la Rubia, J. Moreno y J. GonzálezLópez. 1988. Root exudates of *Zea mays* and production of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter chroococcum*. *Plant Soil* 110: 149–152
- Nieto, K.F. y W.T. Frankenberger Jr. 1991. Influence of adenine, isopentyl alcohol and *Azotobacter chroococcum* on the vegetative growth of *Zea mays*. *Plant Soil* 135: 213–221.
- Paul, E.A. y F.E. Clark. 1996. *Soil microbiology and biochemistry*. 2th ed. Academic Press. San Diego, CA.
- Rancho La Concordia. 2003 *Blueberry en la Sierra Norte de Puebla*.
- Sprent, J.I. y S.M. D' Faria. 1988. Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. *Plant Soil* 110: 157–165.
- Utkhede, R.S., C.A. Koch y J.G. Menzies. 1999. Rhizobacterial growth and yield promotion of cucumber plants inoculated with *Pythium aphanidermatum*. *Can. J. Plant Pathol.* 21: 265-271.
- Van Peer, R., G.J. Niemann y B. Schippers. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology* 81: 728-734
- VERGEL, El arándano, Especies y Variedades [en línea] Juramento 2059 Piso 2 BuenosAires, Argentina, 2003 [fecha de consulta Enero 2015]. Disponible en: <<http://www.vergel.com/espyvariedades>>

Wirén, N.V., V. Römheld, J.L. Morel, A. Guckert y H. Marschner. 1993. Influence of microorganisms on iron acquisition in maize. *Soil Biol. Biochem.* 25(3): 371-376

Yang, Ch.H. y D.E. Crowley. 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied Environ. Microbiol.* 66: 345-351.

Zhulin, I.B., V.A. Bernalov, M.S. Johnson y B.L. Taylor. 1996. Oxygen taxis and proton motive force in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriology* 178 (17): 5199-520.

Zhuang X, Chen J, Shim H, Bai Z. 2007. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment international*, 33: 406-413.