



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS DE BIOLOGÍA

TÍTULO DE LA TESIS

“POTENCIACIÓN DEL CRECIMIENTO DE CACAHUATE
CRIOLLO HUAQUECHULA POR BACTERIAS RIZOSFÉRICAS
APLICADAS DE FORMA INDIVIDUAL O EN CONSORCIO”

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADO (A) EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:






ARIANA DE JESUS RAMOS

DIRECTOR (A): YOLANDA ELIZABETH MORALES
GARCIA

CO-DIRECTOR: JESÚS MUÑOZ ROJAS

27 de AGOSTO 2020

Potenciación del crecimiento de cacahuete criollo Huaquechula por bacterias rizosféricas aplicadas de forma individual o en consorcio

Ariana de Jesús-Ramos^{1,2} , Antonino Baez² , Dalia Molina-Romero^{1,2} ,
Jesús Muñoz-Rojas^{2*} , Yolanda Elizabeth Morales-García^{1,2***} 

¹Licenciatura en Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

²Grupo “Ecology and Survival of Microorganisms”, Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Email autores corresponsales: *joymerre@hotmail.com; **lissiamor@yahoo.com.mx

Recibido: 26 junio 2020. **Aceptado:** 6 agosto 2020

RESUMEN

El cacahuete es una planta que se cultiva ampliamente alrededor del mundo. En este trabajo se exploraron algunas condiciones para la germinación efectiva de semillas de cacahuete criollo Huaquechula. Además, se exploró la capacidad de *Azospirillum brasilense* Sp7, *Paraburkholderia unamae* MT1-641, *Pseudomonas putida* KT2440, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 y *Sphingomonas* sp. OF178 para adherirse a semillas, colonizar la rizósfera y estimular el crecimiento de las plantas; tanto solas como en consorcio. Las semillas de cacahuete sin esterilizar y con tegumento fueron las mejores en germinar. Todas las bacterias exploradas fueron capaces de adherirse a las semillas y colonizar la rizósfera de las plantas, la colonización de *Sphingomonas* sp. OF178, *A. brasilense* Sp7 y *P. putida* KT2440 en consorcio fue mayor en comparación a su colonización individual, sugiriendo que, en consorcio algunas bacterias incrementan su capacidad de interacción. La mayoría de las bacterias incrementaron la longitud del tallo de las plantas cuando se inocularon de forma individual, *A. brasilense* Sp7 fue capaz de aumentar el crecimiento de la raíz de las plantas y *Sphingomonas* sp. Of178 incrementó el peso seco de las raíces. Interesantemente, tras la inoculación con el consorcio de las bacterias se observaron incrementos en la longitud del tallo y raíz, así como en el peso seco de las raíces, lo que sugiere un sinergismo entre las bacterias del consorcio que potencia el desarrollo de las plantas. En el proceso de germinación, las semillas inoculadas con el consorcio de

bacterias mostraron menor contaminación por hongos con referencia a las no inoculadas; lo que sugiere, que el biocontrol de hongos fitopatógenos que afectan a la semilla durante la germinación, podría ser un mecanismo involucrado en la promoción del crecimiento del cacahuete.

Palabras clave: Cacahuete, PGPR, Rizósfera, Adhesión a semillas, Colonización bacteriana.

ABSTRACT

Peanut is a plant widely grown around the world. In this work some conditions to successfully germinate peanut seeds were explored. In addition, the ability of *Azospirillum brasilense* Sp7, *Paraburkholderia unamae* MT1-641, *Pseudomonas putida* KT2440, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 and *Sphingomonas* sp. OF178 to adhere to seeds, colonize the rhizosphere and stimulate the plant growth was explored; both alone or in consortium. Peanut seeds without sterilization and with tegument were the best to germinate. All the bacterial species explored were able to adhere to the seeds and colonize the rhizosphere of plants, rhizospheric colonization of *Sphingomonas* sp. OF178, *A. brasilense* Sp7 and *P. putida* KT2440 in consortium was higher compared to their individual colonization, suggesting that some bacteria increase their interaction capability in the consortium. Stem length was increased after individual inoculation of most bacteria. *A. brasilense* Sp7 increased the growth of plant roots and *Sphingomonas* sp. OF178 increased the root dry weight. Interestingly, the bacterial consortium increased both stem and root length as well as root dry weight, suggesting synergism between bacteria to enhance plant development. In the germination process, the seeds inoculated with the bacteria consortium showed less contamination by fungi with reference to non-inoculated seeds; it suggests, that biocontrol of phytopathogenic fungi that affect the seed during germination, could be a mechanism involved in growth promotion of peanut.

Keywords: Peanut, PGPR, Rhizosphere, Adhesion to seeds, Bacterial colonization.

INTRODUCCIÓN

El cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) es una planta que se clasifica dentro de la familia de las Leguminosas, subfamilia Papilionácea, género *Arachis*. El nombre común del cacahuete varía en función de la región donde

se cultiva [1]; entre los que se destacan los siguientes: cacahuete, cacahuete, maní, amendoim, mandubí. Sus nombres en inglés son: peanut, groundnut, earthnut, monkey nut, manila nut, chinese nut, pindar pea, goober pea [2]. De las 12 especies conocidas, la más

importante es la *Arachis hypogaea* Lineau, el cacahuete común. Esta especie se caracteriza por la producción subterránea de semillas con alto contenido de aceite y proteínas [3,4]. El contenido de aceite es de aproximadamente 44% a 56% [5]. El cacahuete se utiliza en la gastronomía para la elaboración de botanas, galletas, panes, dulces, cereales y ensaladas, además se usa en la industria alimentaria y cosmética para la producción de aceites, harinas, mantequilla, tintas, cremas humectantes y labiales [6]. Sin embargo, también tiene usos medicinales para tratar afecciones de la piel y como dietético [7].

De acuerdo con datos de la FAO, en el año 2010 se reportó que en el mundo se cultivaron alrededor de 24 millones de hectáreas (ha) de cacahuete, siendo China, India, Nigeria, Estados Unidos y Senegal los principales países productores [8], sin embargo, estas cifras han variado y en 2017 se cultivaron alrededor de 29 millones de ha. En México se siembran alrededor de 66,709 ha, concentrando el 80.48 % de su producción en los estados de Sinaloa, Puebla, Oaxaca, Chiapas y Chihuahua. Huaquechula es el municipio de Puebla con mayor producción de cacahuete con una superficie sembrada de 1300 ha aproximadamente [6].

Uno de los principales problemas que afectan a la producción de cacahuete son las

enfermedades causadas por plagas, hongos fitopatógenos y las condiciones climáticas para cultivos de temporal [9]. Para mitigar el daño causado por los hongos fitopatógenos se han usado antifúngicos sintéticos, sin embargo, los hongos han desarrollado resistencia ante estos productos y además la mayoría de estos compuestos son contaminantes para el medioambiente y tóxicos para otros seres vivos [10]. Los microorganismos benéficos potencian el rendimiento de los cultivos por lo que podrían ser una solución sustentable para incrementar los rendimientos de los cultivos agrícolas [11]. Además, éstos han sido propuestos como una alternativa de control biológico para eliminar a los hongos fitopatógenos de una manera amigable con el medioambiente [12,13]. Los microorganismos benéficos han sido aislados del suelo, la rizósfera, el rizoplano, del interior de plantas y de la región epífita [11,14]. Los microorganismos rizosféricos han sido extensamente estudiados en sus capacidades para estimular el crecimiento de diversas plantas y se definen como aquellos que viven en el suelo influenciado por los exudados de las raíces de las plantas [14]. Recientemente, se ha observado que los consorcios bacterianos pueden ser mejores promotores del crecimiento de plantas que el uso de bacterias en forma individual [11,12]. En el cacahuete se ha

explorado la capacidad de algunas bacterias benéficas para promover su crecimiento [15–17]. Sin embargo, no se ha explorado si un consorcio es capaz de promover el crecimiento de esta planta y tampoco se ha evaluado en cacahuate criollo de Huaquechula.

En el presente trabajo se exploraron algunas variables para evaluar la germinación de las semillas de cacahuate criollo Huaquechula; 1) semillas no estériles con tegumento NE/CT, 2) semillas no estériles sin tegumento (NE/ST), 3) semillas estériles con tegumento (E/CT) y 4) semillas estériles sin tegumento (E/ST). Además, se exploró la capacidad de diversas especies de bacterias benéficas (*P. putida* KT2440, *G. diazotrophicus* PA1 5, *P. unamae* MTI-641, *A. brasilense* Sp7, y *Sphingomonas* sp. OF178) para adherirse a semillas, colonizar la rizósfera y estimular el crecimiento de plantas; tanto de forma individual como en consorcio.

MATERIALES Y MÉTODOS

A. Germinación de semillas de cacahuate

En este trabajo se usaron semillas de cacahuate de una variedad criolla de Huaquechula, Puebla, México, que lleva adaptada en esa región por más de 500 años y que se conoce por los pobladores como “cacahuate pequeño criollo” [6,18]. En este trabajo esa semilla se designó como criolla-Huaquechula. Las

semillas fueron llevadas al laboratorio donde se destinaron 40 semillas para cada tratamiento de germinación: semillas no estériles con tegumento (NE/CT), semillas no estériles sin tegumento (NE/ST), semillas estériles con tegumento (E/CT) y semillas estériles sin tegumento (E/ST). La esterilización de las semillas para los tratamientos E/CT y E/ST se realizó como en trabajos previos [19,20]. Para ello las semillas fueron desinfectadas con etanol al 70% durante 30 segundos, lavadas y colocadas en una solución de hipoclorito de sodio al 1.62% durante 10 minutos, las semillas se lavaron 10 veces con agua destilada estéril dentro de la campana de flujo laminar. Posteriormente, las semillas de cada tratamiento fueron colocadas en 5 g de vermiculita estéril contenidos en tubos cónicos de 50 mL [20], se regaron con 25 mL de agua y se mantuvieron dentro de una cámara de plantas con un fotoperiodo luz/obscuridad 16/8 h a una temperatura de 28/25 °C. La germinación se evaluó a los 7 días posteriores al sembrado, midiendo presencia de raíz y brote. El crecimiento de las plantas que provienen de semillas NE/CT fue seguido hasta los 20 días, debido a que fueron las que mejor germinaron; se registró la apariencia de las plantas y a los 20 días se midió el tamaño del tallo y la raíz, el número de hojas, así como el número de ramificaciones.

B. Alteración en el porcentaje de germinación de cacahuete criollo Huaquechula por la inoculación bacteriana.

Los microorganismos usados en este trabajo fueron *P. putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178, *P. unamae* MTI-641, *A. brasilense* Sp7, y *G. diazotrophicus* PAI 5. Todas las cepas bacterianas fueron crecidas masivamente en placas conteniendo 30 mL medio sólido de selección durante 24 h para *P. putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178 y *P. unamae* MTI-641) ó durante 48 h para *A. brasilense* Sp7 y *G. diazotrophicus* PAI 5. Los medios de selección fueron diseñados previamente [21] y son los siguientes: Para *Sphingomonas* sp. OF178 el medio LB 5% adicionado con cloranfenicol (30 µg/mL) y ceftriaxona (30 µg/mL), para *A. brasilense* Sp7 se usó el medio Rojo Congo con ceftriaxona (100 µg/mL), para *P. putida* KT2440 se usó LB con cloranfenicol (100 µg/mL), para *G. diazotrophicus* PAI 5 se usó el medio LGI adicionado con ceftazidima (70 µg/mL) y para *P. unamae* MTI-641 se usó el medio BAc adicionado con cefotaxima (70 µg/mL). Las bacterias crecidas en cada placa se removieron con ayuda de una espátula estéril y se resuspendieron en 30 mL de agua estéril [22]. Cada suspensión bacteriana fue centrifugada y el pellet obtenido se resuspendió en el mismo volumen de agua destilada estéril

(este proceso se realizó dos veces); conteniendo al final un orden de 10^8 UFC/mL en acuerdo con nuestros datos de cuantificación mediante el método de goteo en placa [23]. Se hizo una mezcla de las 5 cepas bacterianas colocando 5 mL de cada una de ellas en un tubo cónico de 50 mL estéril (consorcio). Cada suspensión bacteriana (tanto con bacterias independientes y el consorcio) sirvió para inocular 40 semillas de cacahuete NE/CT, sumergiéndolas durante una hora en un vaso de precipitado de 100 mL de capacidad [23,24]. Las semillas inoculadas se sembraron en tubos cónicos de 50 mL conteniendo 5 g de vermiculita estéril y se incubaron en la cámara de plantas con un fotoperiodo luz/obscuridad 16/8 h a 28/25 °C. Se incluyeron controles sin inocular donde las semillas solo fueron sumergidas en agua destilada estéril. El porcentaje de semillas germinadas, para cada tratamiento, fue evaluado a los 7 días.

C. Adhesión, colonización y efecto en la promoción del crecimiento de semillas de cacahuete criollo Huaquechula por bacterias benéficas.

En un experimento independiente, 40 semillas de cacahuete NE/CT fueron usadas para ser inoculadas con las suspensiones bacterianas tanto de bacterias independientes como en consorcio, tal como se describió en el

experimento anterior. A las 12 horas se sacaron 5 semillas y se evaluó la capacidad de adhesión de las bacterias. Para ello, las 5 semillas de cada tratamiento fueron extraídas de la vermiculita y se colocaron en 3 mL de agua destilada estéril en un tubo cónico de 15 mL. Cada tubo fue agitado vigorosamente usando un vortex a velocidad máxima y se realizaron diluciones seriadas (1:10) para cuantificar el número de bacterias presentes; mediante el método de goteo en placa [25]. Los medios de selección para la cuantificación fueron los que se mencionaron previamente [22]. Las semillas restantes se colocaron bajo condiciones de la cámara incubadora de plantas. Las plántulas que germinaron en la cámara de incubación fueron regadas con agua destilada estéril en la campana de flujo laminar cada 5 días. Después de 20 días posteriores a la inoculación (dpi) se evaluó la capacidad de las bacterias para colonizar la rizósfera de las plantas. Para ello, se extrajeron 5 plantas, se sacudió la vermiculita y la raíz fue sumergida en 5 mL de agua destilada estéril. Se agitó vigorosamente con ayuda de un vortex y la suspensión resultante fue usada para la cuantificación de bacterias mediante el método de goteo en placa [25], usando los medios de selección para cada bacteria [22]. A los 20 dpi, en todas las plantas se midieron los parámetros de crecimiento (longitud de tallo, longitud de raíz, número de

hojas, número de ramas, peso fresco raíz, peso fresco región aérea, peso seco raíz, peso seco región aérea), como se ha descrito en trabajos previos [20,26]. Los datos de los parámetros de crecimiento fueron analizados mediante el uso de Anova de una vía y además 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 [26].

D. Inhibición de hongos por bacterias benéficas durante la germinación

Debido a que las semillas de este trabajo no fueron esterilizadas para los estudios de inoculación (tratamiento NE/CT), se decidió medir el porcentaje de semillas contaminadas por hongos en ensayos de germinación en agar agua. Para ello, en un experimento independiente, se germinaron 50 semillas de cada tratamiento en agar agua. Un tratamiento consistió en semillas no inoculadas (sumergidas solo en agua destilada estéril) y otro en semillas inoculadas con el consorcio durante 1 h. Después de la inoculación, las semillas se colocaron en las placas de agar agua, se incubaron bajo las condiciones descritas anteriormente en el apartado “C” y cada día se registró el número de semillas contaminadas por hongos. Se calculó el porcentaje de

contaminación y se tomaron fotografías para observar la contaminación por hongos.

RESULTADOS

A. Evaluación de parámetros de crecimiento para la germinación del cacahuete y su crecimiento en sistemas in vitro, sin inoculación de bacterias benéficas.

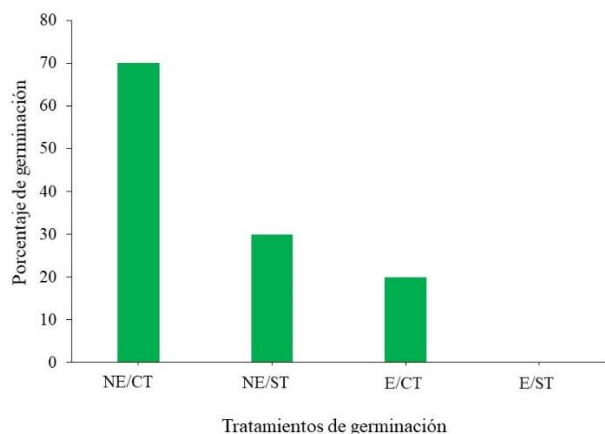


Figura 1. Porcentaje de germinación de semillas de cacahuete evaluando cuatro tratamientos experimentales, sin inoculación de bacterias benéficas.

Las semillas de cacahuete de la variedad criolla-Huaquechula se germinaron bajo 4 condiciones experimentales (NE/CT, NE/ST, E/CT y E/ST), observando que la germinación de semillas NE/CT fueron las que mejor germinaron. Ninguna de las semillas E/ST logró germinar. Las semillas NE/ST mostraron una germinación disminuida y las semillas E/CT también tienen una germinación afectada (Fig. 1). Este experimento fue realizado dos veces con tendencias similares. Para posteriores experimentos se usaron las semillas NE/CT.

Los germinados de las semillas NE/CT mostraron un desarrollo que fue considerado como basal con las siguientes características: en el día 3 se observó la germinación de la semilla, mostrándose un ápice muy corto pero prominente (Fig. 2A), al día 5 la radícula era de aproximadamente 1.5 cm (Fig. 2B), para el día 7 se observó que la semilla de cacahuete se partió en dos partes e inició el crecimiento del brote (Fig. 2C). La raíz de las plantas medía en promedio 3 cm.

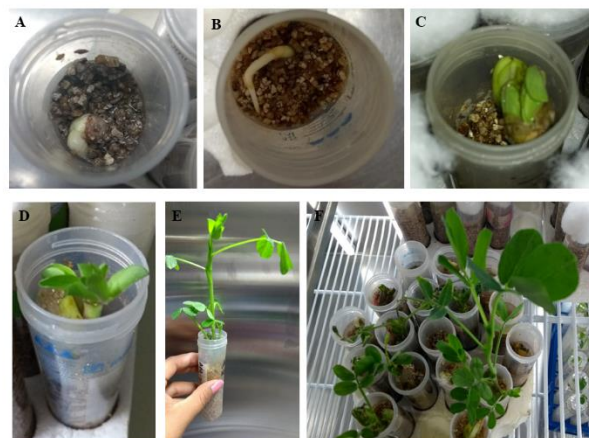


Figura 2. Crecimiento de las plántulas de cacahuete a partir de semillas NE/CT, sin inoculación de bacterias benéficas.

Para el día 9 se observó un pequeño tallo y hojas muy pequeñas (Fig. 2D). Para el día 17 se obtuvo un tamaño en el rango de 11.4 a 15.3 cm en todas las plántulas (Fig. 2E). Las hojas fueron completamente ovaladas y no todas las plantas crecieron del mismo tamaño (Fig. 2F). El crecimiento de las plántulas se vigiló hasta el día 20, observando que se encuentran sanas de coloración verde, se midió la longitud del tallo,

longitud de raíz, número de hojas y ramificaciones de las plántulas (Fig. 3). El número de hojas fue un parámetro muy variable en comparación con los otros parámetros medidos en este ensayo.

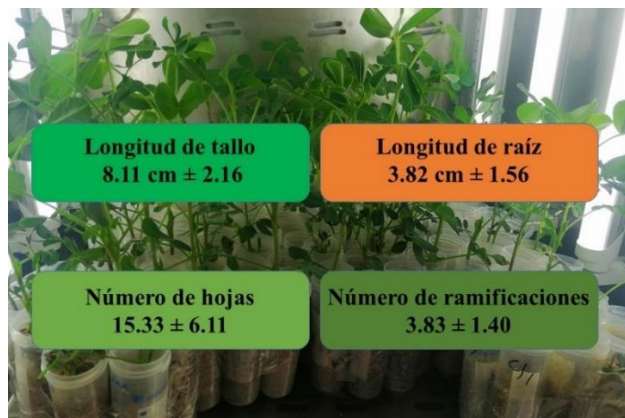


Figura 3. Plántulas de cacahuate después de 20 días, crecidas a partir de semillas NE/CT.

B. Influencia de la inoculación bacteriana en la germinación de cacahuate criollo Huequechula con semillas NE/CT.

Los porcentajes de germinación fueron alterados con la inoculación de algunos microorganismos. La inoculación de *P. putida* KT2440 y *A. brasilense* Sp7 no alteraron la capacidad de germinación del cacahuate respecto de semillas no inoculadas. Las semillas inoculadas con *G. diazotrophicus* PAI 5 y la mezcla de microorganismos disminuyeron un 21% su capacidad de germinación, mientras que *Sphingomonas* sp. OF178 disminuyó un 10% la capacidad de germinación de las semillas inoculadas, respecto a semillas no inoculadas. Solo *P.*

unamae MTI-641 fue capaz de incrementar la germinación de semillas de cacahuate en un 27% respecto a las semillas control.

C. Adhesión y colonización de plántulas de cacahuate por los microorganismos explorados.

Los microorganismos inoculados de manera independiente fueron capaces de adherirse a la semilla de cacahuate y de colonizar la rizósfera de las plantas en números variables en función del tipo de microorganismo (Tablas 1 y 2). La adhesión a las semillas de cacahuate fue observada en el orden de 10^6 para la mayoría de las bacterias exploradas individualmente (Tabla 1). El valor de adhesión más alto fue observado para *A. brasilense* Sp7, en el orden 10^8 UFC/mL. La adhesión a las semillas con la mezcla de microorganismos se mostró en el orden 10^7 UFC/mL para *P. unamae* MTI-641 y *Sphingomonas* sp. OF178, 10^6 para *P. putida* KT2440 y no fue posible detectar a *A. brasilense* Sp7 y *G. diazotrophicus* PAI 5 (Tabla 1). En semillas no inoculadas, también se detectó el crecimiento de algunos microorganismos, como hongos de tipo micelial y colonias amarillas de tipo bacteriano (Tabla 1).

La colonización individual de los microorganismos en la rizósfera de cacahuate se observó variable, en el orden de 10^3 UFC/mL para *Sphingomonas* sp. OF178, 10^4 UFC/mL

para *A. brasilense* y *P. putida* KT2440 y 10^6 UFC/mL para *G. diazotrophicus* PAI 5 y *P. unamae* MTI-641 (Tabla 2). Todas las bacterias del consorcio fueron capaces de colonizar la rizósfera de cacahuete y se detectaron en el orden de 10^6 a 10^8 UFC/mL (Tabla 2). La colonización de *Sphingomonas* sp. OF178, *A. brasilense* Sp7 y *P. putida* KT2440 fue incrementada en el consorcio en comparación con la colonización individual de las cepas bacterianas. En plantas control que provienen de semillas no inoculadas, nuevamente se detectó el crecimiento de hongos en el orden 10^6 UFC/mL y además, de bacterias que forman colonias amarillas en el orden 10^7 UFC/mL. Las plantas inoculadas con bacterias individuales o con el consorcio no mostraron hongos detectables en la rizósfera, ni bacterias diferentes a las inoculadas.

D. Efectos de la inoculación con bacterias benéficas en el crecimiento de cacahuete.

Con las plántulas que brotaron, se evaluó la capacidad de las bacterias para estimular su crecimiento a los 20 dpi. A excepción del tratamiento de plantas inoculadas con *Sphingomonas* sp. OF178, en los demás tratamientos se observó un incremento en la longitud del tallo del cacahuete, respecto al tratamiento control (Tabla 3). La cepa *P. putida* KT2440 fue la que incrementó más la longitud

del tallo de las plantas. La longitud de la raíz fue incrementada en tratamientos inoculados con la cepa *A. brasilense* Sp7 y con la mezcla de microorganismos (Tabla 3). El número de hojas y de ramas fue muy similar entre todos los tratamientos, excepto para las plantas inoculadas con *P. unamae* MTI-641 y *Sphingomonas* sp. OF178, donde se observó una disminución ligera pero significativa respecto a plantas no inoculadas. El peso fresco de raíz y región aérea fue estadísticamente similar entre todos los tratamientos, aunque las plantas inoculadas con la mezcla mostraron una tendencia de incremento de sus valores (Tabla 3). Interessantemente el peso seco de la raíz fue significativamente mayor en plantas inoculadas con *Sphingomonas* sp. OF178 y con la mezcla de microorganismos. No se detectaron diferencias en el peso seco de la región aérea de los tratamientos inoculados con referencia al tratamiento control.

Tabla 1. Adhesión de bacterias a las semillas de cacahuete (NE/CT).

Cepa	Log UFC/mL de bacterias adheridas de forma individual	Log UFC/mL de bacterias adheridas en consorcio	NMC
<i>Sphingomonas</i> sp. OF178	6.62 (± 0.13)	7.18 (± 0.18)	Hnb
<i>A. brasilense</i> Sp7	8.09 (± 0.04)	ND	ND
<i>P. putida</i> KT2440	7.85 (± 0.34)	6.73 (± 0.23)	7.15 (± 0.28)*
<i>G. diazotrophicus</i> PAI5	6.69 (± 0.16)	ND	ND
<i>P. unamae</i> MTI-641	6.28 (± 0.13)	7.17 (0.12)	ND

NMC es el número de microorganismos contaminantes detectados en controles en los medios de selección. Hnb significa hongos detectados en números bajos; el crecimiento corresponde a hongos miceliales de color blanco. ND significa que no se detectaron microorganismos en el medio explorado. Cada valor representa la media de 9 determinaciones seguidas de la desviación estándar. Los

medios de selección usados para cada bacteria, se muestra en materiales y métodos. *La morfología corresponde a hongos

miceliales de color blanco y colonias bacterianas amarillas muy diferentes a *P. putida* KT2440.

Tabla 2. Colonización de microorganismos en rizósfera de cacahuete (20 dpi).

Cepa	Log UFC/mL de bacterias que colonizan de forma individual	Log UFC/mL de bacterias que colonizan en consorcio	NMC
<i>Sphingomonas</i> sp. OF178	3.79 (± 0.52)	7.8 (± 0.50)	6.43 (0.63)*
<i>A. brasilense</i> Sp7	4.57 (± 0.86)	8.87 (± 0.65)	ND
<i>P. putida</i> KT2440	4.39 (± 0.49)	8.43 (± 0.72)	7.69 (0.55)**
<i>G. diazotrophicus</i> PA15	6.55 (± 0.46)	6.04 (± 0.58)	ND
<i>P. unamae</i> MT1-641	6.26 (± 0.49)	6.69 (± 0.81)	ND

Número (log UFC/mL) de microorganismos que colonizaron la rizósfera. NMC es el número de microorganismos contaminantes detectados en controles en los medios de selección. ND significa que no se detectaron microorganismos en el medio explorado. Cada valor representa la media de 9 determinaciones seguidas de la desviación estándar. Los medios de selección usados para cada bacteria, se muestra en materiales y métodos. *El crecimiento corresponde a hongos miceliales de color blanco. **La morfología corresponde a hongos miceliales de color blanco y a colonias bacterianas amarillas muy diferentes a *P. putida* KT2440.

Tabla 3. Efectos de la inoculación bacteriana en el tamaño de las plantas a los 20 dpi.

Parámetro de medición	<i>Cepa bacteriana inoculada</i>						
	Control	KT2440	SP7	PAI 5	MT1-641	OF178	Mezcla de bacterias
Longitud de tallo (cm)	7.65 D (± 1.9674)	13.86 A (± 1.4117)	12.15 AB (± 2.6048)	10.27 BC (± 2.8529)	9.94 B (± 1.6056)	8.07 CD (± 1.1087)	10.03 BC (± 1.88)
Longitud de raíz (cm)	5.88 CD (± 1.04)	7.12 ABCD (± 1.59)	8.6455 A (± 1.96)	5.47 BCD (± 1.42)	6.34 BC (± 1.00)	4.92 D (± 0.98)	7.71 A (± 0.84)
Número de hojas	21.81 AB (± 4.85)	17.60 BC (± 6.69)	22.18 AB (± 4.85)	17.71 BC (± 3.90)	17.71 BC (± 4.06)	15.00 C (± 2.00)	21.33 AB (± 2.06)
Número de ramas	6.00 AB (3-7)	5.00 ABC (3-6)	5.00 AB (3-7)	4.00 BC (3-6)	4.00 BC (3-6)	4.00 C (3-4)	5.00 AB (5-6)
Peso fresco raíz	1.72 ABCD (± 0.68)	1.05 D (± 0.20)	2.36 AB (± 1.10)	2.16 AB (± 0.32)	1.80 BC (± 0.46)	1.63 C (± 0.30)	2.27 A (± 0.42)
Peso fresco región aérea	1.95 A (± 0.57)	1.14 B (± 0.13)	2.32 A (± 1.25)	1.72 A (± 0.44)	1.90 A (± 0.68)	1.67 A (± 0.19)	2.05 A (± 0.74)
Peso seco raíz	0.12 B (± 0.08)	0.09 B (± 0.03)	0.14 AB (± 0.15)	0.11 B (± 0.06)	0.17 AB (± 0.27)	0.18 A (± 0.09)	0.19 A (± 0.05)
Peso seco región aérea	0.22 AB (± 0.19)	0.12 B (± 0.03)	1.31 AB (± 1.86)	0.24 A (± 0.09)	0.13 B (± 0.09)	0.13 B (± 0.01)	0.22 AB (± 0.25)

Letras negritas iguales en cada renglón indican que no existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos a $P \leq 0.05$. Los valores muestran la media y su respectiva desviación estándar en paréntesis. Para número de ramas se muestra la mediana y el valor mínimo y máximo en paréntesis. Color verde indica diferencia estadística positiva respecto a controles y color rojo indica diferencia estadística negativa respecto a controles. Las diferencias entre tratamientos fueron observadas con el análisis Anova de una vía y las diferencias estadísticas fueron comprobadas mediante el análisis pareado *t*-student.

E. Inhibición del crecimiento de hongos por bacterias durante la germinación

El porcentaje de semillas contaminadas de los germinados de cacahuete inoculados con el consorcio bacteriano, claramente fue menor al porcentaje de semillas germinadas de cacahuete no inoculadas (Tabla 4, Fig. 4). En el día 1 y 2 no se logran observar semillas contaminadas en ninguno de los tratamientos, en el día 3 ya inicia una diferencia notoria de las semillas contaminadas, pero esta fue más marcada en las semillas no inoculadas. Para el día 4 la contaminación es elevada para semillas no inoculadas (64%) contra (42%) de las inoculadas con el consorcio de bacterias, además, el crecimiento de los hongos es mayor en las semillas no inoculadas (Fig. 4). En el día 5 ya hay un 86% de semillas contaminadas por hongos en semillas no inoculadas contra 56% de semillas inoculadas con el consorcio de bacterias. Nuevamente el crecimiento de los hongos de semillas no inoculadas fue mayor al de semillas inoculadas con el consorcio bacteriano.

Tabla 4. Porcentaje de contaminación con hongos en semillas de cacahuete germinadas en placas con agar agua.

Tratamiento	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Semillas inoculadas con el consorcio	ND	ND	25%	42%	56%
Semillas no inoculadas	ND	ND	48%	64%	90%

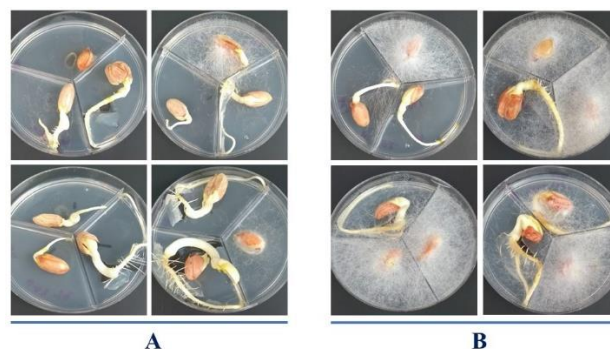


Figura 4. Ejemplos de germinación de cacahuete en agar agua, bajo dos condiciones experimentales: A) semillas inoculadas con el consorcio de 5 cepas bacterianas, B) semillas no inoculadas. El tiempo de germinación corresponde al día 4.

DISCUSIÓN

En nuestra experiencia la mayoría de trabajos donde se explora la capacidad de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal se hace con semillas que son desinfectadas y esterilizadas superficialmente [19,20,27], incluso para cacahuete [15,28]. Sin embargo, con las semillas de cacahuete criollo de Huaquechula no fue posible obtener una tasa de germinación que nos permitiera desarrollar los ensayos cuando se desinfectaron con alcohol y se esterilizaron con hipoclorito de sodio. Aunado a esto, cuando las semillas fueron despojadas de su tegumento, estas no germinaron adecuadamente. Se ha reportado que las semillas de pimiento morrón son sensibles a hipoclorito de sodio [29] y por otro lado se ha sugerido la relevancia de los microbiomas de las semillas como esenciales para su germinación y mantenimiento de salud [30]. En

nuestro trabajo no se exploró si las semillas son altamente sensibles al hipoclorito o si el tegumento contiene microorganismos que le permiten una germinación adecuada a las semillas de cacahuete, por lo que será importante estudiar esto en el futuro. Sin embargo, al observar que las semillas con tegumento sin esterilizar (NE/CT) son las que mejor germinaron, se decidió por realizar los experimentos de interacción con bacterias benéficas con este tipo de semillas.

Frecuentemente se reporta que la capacidad de germinación de semillas es incrementada con la inoculación de microorganismos benéficos [31–33]. Sin embargo, en este trabajo observamos que *P. putida* KT2440 y *A. brasilense* Sp7 no alteraron la capacidad de germinación del cacahuete respecto de semillas no inoculadas. Las semillas inoculadas con *G. diazotrophicus* PA1 5 y la mezcla de microorganismos disminuyeron un 21 % su capacidad de germinación, mientras que *Sphingomonas* sp. OF178 disminuyó un 10 % la capacidad de germinación de las semillas inoculadas, respecto a semillas no inoculadas. Solo *P. unamae* MTI-641 fue capaz de incrementar la germinación de semillas de cacahuete en un 27 % respecto a las semillas control. La razón por la que el consorcio inhibió la capacidad de germinación bajo las condiciones exploradas aún no se conoce, sin

embargo, es posible que el entorno de la semilla es modificado por los microorganismos y se sabe que dependiendo las condiciones del entorno (ejemplo: del medio de cultivo) la capacidad de germinación puede variar [34].

Las bacterias usadas en este trabajo son conocidas por sus capacidades promotoras del crecimiento vegetal en otras plantas, por ejemplo, *A. brasilense* Sp7 estimula el crecimiento de maíz y trigo [35,36], *G. diazotrophicus* el de caña de azúcar [37], *P. putida* KT2440 el de maíz y la biznaga [27,38], *P. unamae* MTI-641 al de tomate [39] y *Sphingomonas* OF178 al de maíz [22]. En este trabajo se observó que estas bacterias incrementan el desarrollo de la longitud de plantas de cacahuete de la variedad criolla Huaquechula, respecto a plantas no inoculadas, excepto *Sphingomonas* sp. OF178. Además, *A. brasilense* Sp7 incrementó la longitud de la raíz y *Sphingomonas* sp. OF178 aumentó el peso seco de raíz a los 20 dpi. Interesantemente el consorcio incrementó la longitud del tallo, la longitud de raíz y el peso seco de raíz, lo que indica que cuando las cepas bacterianas están en consorcio, las capacidades de todas se combinan y dan como resultado efectos positivos en los incrementos de plantas. En los últimos años se ha observado que los consorcios de bacterias son más efectivos para promover el crecimiento de plantas que las

bacterias individuales y se ha planteado un sinergismo entre las cepas integrantes de los consorcios [11,26,40,41]. En el presente trabajo se observó que ese proceso está ocurriendo, ya que los tres parámetros de crecimiento (longitud del tallo, la longitud de raíz y el peso seco de raíz) que algunas bacterias incrementaron de forma independiente, también se incrementaron cuando las plantas de cacahuate fueron inoculadas con el consorcio.

La adhesión y colonización son los primeros pasos relevantes para que ocurra una adecuada interacción entre una bacteria benéfica con las plantas [11,42]. En el presente trabajo todas las bacterias exploradas se adhieren bien a las semillas de maíz cuando interactúan independientemente. El comportamiento de adhesión en consorcio fue similar para *P. unamae* MT1-641, *Sphingomonas* sp. OF178 y *P. putida* KT2440, pero no fuimos capaces de detectar a *G. diazotrophicus* PAI 5 y a *A. brasilense* Sp7, no obstante, sugerimos que ésta fue adecuada porque la colonización fue elevada para todas las cepas bacterianas exploradas. La colonización de las bacterias en forma independiente osciló en el rango de 10^6 - 10^8 UFC/mL, muy similar a lo reportado para gramíneas con estas mismas bacterias [21,26,27,37,43]. Interesantemente, la colonización en consorcio fue potenciada con respecto con la colonización individual para

Sphingomonas sp. OF178, *A. brasilense* Sp7 y *P. putida* KT2440. El incremento en la capacidad para colonizar la rizósfera de maíz cuando las bacterias están en consorcio, en comparación con la colonización de las bacterias en forma individual, también se ha observado para maíz y papa [21,44]. Esto significa que en conjunto las bacterias activan otras potencialidades que les permiten colonizar más adecuadamente en su entorno.

Como los experimentos de inoculación se realizaron en semillas de cacahuate no estériles (NE/CT), se observó el crecimiento de microorganismos acoplados en las semillas no inoculadas. Se detectó el crecimiento de hongos formadores de micelio en el orden 10^6 UFC/mL y de bacterias que forman colonias amarillas en el orden 10^7 UFC/mL. A estos microorganismos los llamamos contaminantes en este trabajo, sin embargo, se tiene que realizar un estudio más detallado para saber si son microorganismos patógenos o benéficos y si son parte de la composición del microbioma de la semilla de cacahuate. Se ha reportado que los hongos miceliales como *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, son patógenos del cacahuate [15,45,46]. Los hongos encontrados en nuestro trabajo no fueron caracterizados, sin embargo, será importante caracterizarlos en el futuro porque podrían ser responsables de efectos

negativos en las plantas de cacahuete de la variedad criollo Huaquechula.

La rizósfera de plantas inoculadas con bacterias independientes y con el consorcio no mostraron la presencia de hongos, lo que nos hizo suponer que estas bacterias estaban inhibiendo el crecimiento de los hongos. Se ha reportado que las 5 bacterias exploradas en este trabajo producen sustancias inhibitorias contra hongos patógenos [47–51]. Por esta razón, se realizó un experimento de germinación con semillas inoculadas con el consorcio y semillas sin inocular, observando claramente que la contaminación por hongos es mayor en semillas que no fueron inoculadas, sugiriendo que las bacterias del consorcio ejercen un control sobre el crecimiento de los hongos, lo que podría significar uno de los mecanismos mediante los cuales las bacterias benéficas exploradas promueven el crecimiento del cacahuete, como ha sido sugerido para otras plantas [13,52]. Los efectos de estimulación de crecimiento por bacterias benéficas en semillas de cacahuete no estériles nos acercan más a la realidad y los resultados de este trabajo tienen alto potencial para la aplicación del consorcio explorado en cacahuete de la variedad criollo Huaquechula.

CONCLUSIÓN

Los resultados del presente trabajo muestran que existe un efecto sinérgico entre las bacterias

del consorcio que potencian el crecimiento de las plantas de cacahuete. Todas las bacterias exploradas fueron capaces de adherirse a las semillas de cacahuete NE/CT y de colonizar la rizósfera de las plantas. Sin embargo, la colonización rizosférica de *Sphingomonas* sp. OF178, *A. brasilense* Sp7 y *P. putida* KT2440 se incrementó cuando las bacterias se inocularon en mezcla, en comparación con su colonización individual. Las bacterias en consorcio impidieron el crecimiento de hongos, lo cual podría significar uno de los mecanismos para promover el crecimiento de plantas.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a VIEP-BUAP por el apoyo para realizar este trabajo. Los investigadores de este trabajo pertenecen al Sistema Nacional de Investigadores CONACYT, por lo que agradecemos a la institución por su apoyo.

REFERENCIAS

- [1]. Cáceres-Lorenzo MT, Salas-Pascual M. Diferenciación de repertorios léxicos en los nombres comunes de las plantas americanas. *Onomazein* [Internet]. 2018;40 (junio de

2018):119–38. Available from: <https://go.gale.com/ps/anonymous?id=GALE%7CA549336565&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=abs&issn=07171285&p=IFME&sw=w>

[2]. Chan K, Zhang HW, Lin ZX. Treatments used in complementary and alternative medicine. In: Aronson JKBT-SE of DA, editor. A worldwide yearly survey of new data in adverse drug reactions and interactions. Elsevier; 2014. p. 889–98.

[3]. Asibuo JY, Akromah R, Safo-Kantanka O, Adu-Dapaah HK, Ohemeng-Dapaah S, Agyeman A. Chemical composition of groundnut, *Arachis hypogaea* (L) landraces. African J Biotechnol. 2008;7(13):2203–8.

[4]. Sarvamangala C, Gowda MVC, Varshney RK. Identification of quantitative trait loci for protein content, oil content and oil quality for groundnut (*Arachis hypogaea* L.). F Crop Res. 2011;122(1):49–59.

[5]. Ferreyra JC, Kuskoski EM, Bordignon Luiz MT, Barrera Arellano D, Fett R. Propiedades emulsificantes y espumantes de las proteínas de harina de cacahuate (*Arachis hypogaea* Lineau). Grasas y Aceites. 2007;58(3):264–9.

[6]. Romano Cadena MM del S, Hernández Vivanco GA, García Alarcón M del R, Moreno Cortés KC. Análisis de la cadena

productiva del cultivo de cacahuate (*Arachis hypogaea* L.) producido en Huaquechula, Puebla. EDUCATECONCIENCIA. 2019;23(24):65–80.

[7]. Hurrell JA, Ulibarri EA, Puentes JP, Buet Constantino F, Arenas PM, Pochettino ML. Leguminosas medicinales y alimenticias utilizadas en la conurbación Buenos Aires-La Plata , Argentina. Boletín Latinoam y del Caribe Plantas Med y Aromáticas. 2011;10(5):443–55.

[8]. FAO. FAOSTAT [Internet]. Web page. 2020 [cited 2019 Dec 1]. Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>

[9]. Reyes-Matamoros J, Martínez-Moreno D, Rueda-Luna R, Paredes-Camacho RM. Prevención de plagas y prácticas culturales en cacahuate (*Arachis hypogaea* L.) bajo temporal en la comunidad de Huaquechula , Puebla , México. Rev Iberoam Ciencias. 2015;2(2):1–10.

[10]. Pazos-Rojas LA, Marín-Cevada V, Elizabeth Y, García M, Baez A. Uso de microorganismos benéficos para reducir los daños causados por la revolución verde. Rev Iberoam Ciencias. 2016;3(7):72–85.

[11]. Morales-García YE, Baez A, Quintero-Hernández V, Molina-Romero D, Rivera-Urbalejo AP, Pazos-Rojas LA, et al. Bacterial mixtures, the future generation of

inoculants for sustainable crop production. In: Maheshwari DK, Dheeman S, editors. Field Crops: Sustainable Management by PGPR [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 11–44. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-030-30926-8_2

[12]. 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(1):19–21.

[13]. Cesa-Luna C, Baez A, Quintero-Hernández V, De la Cruz-Enríquez J, Castañeda-Antonio MD, Muñoz-Rojas J. The importance of antimicrobial compounds produced by beneficial bacteria on the biocontrol of phytopathogens. *Acta Biológica Colomb.* 2020;25(1):140–54.

[14]. Molina-Romero D, Bustillos-Cristales M del R, Rodríguez-Andrade O, Morales-García YE, Santiago-Saenz Y, Castañeda-Lucio M, et al. Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biológicas.* 2015;17(2):24–34.

[15]. Yuttavanichakul W, Lawongsa P, Wongkaew S, Teaumroong N, Boonkerd N, Nomura N, et al. Improvement of peanut rhizobial inoculant by incorporation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as

biocontrol against the seed borne fungus, *Aspergillus niger*. *Biol Control* [Internet]. 2012;63(2):87–97. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964412001351>

[16]. Dey R, Pal KK, Bhatt DM, Chauhan SM. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiol Res* [Internet]. 2004;159(4):371–94. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501304000710>

[17]. Paulucci NS, Gallarato LA, Reguera YB, Vicario JC, Cesari AB, García de Lema MB, et al. *Arachis hypogaea* PGPR isolated from Argentine soil modifies its lipids components in response to temperature and salinity. *Microbiol Res* [Internet]. 2015;173:1–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501314001608>

[18]. Hammons RO, Herman D, Stalker HT. Chapter 1 - Origin and Early History of the Peanut. In: Stalker HT, F. Wilson RBT-P, editors. *Peanuts Genetics, Processing, and Utilization* [Internet]. AOCS Press; 2016. p. 1–26. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781630670382000010>

- [19]. Morales-García YE, Pazos-Rojas LA, Bustillos-Cristales M del R, Krell T, Muñoz-Rojas J. Método rápido para la obtención de axénico a partir de semillas maíz. *Elementos*. 2010;80:35–8.
- [20]. Morales-García YE, Juárez-Hernández D, Aragón-Hernández C, Mascarua-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;43:287–93.
- [21]. Muñoz-Rojas J, Morales-García YE, Juárez-Hernández D, Fuentes-Ramírez LE, Munive-Hernández JA. Formulación de un inoculante multiespecies para potenciar el crecimiento de plantas [Internet]. México; MX2013007978A, 2013. p. 1–36. Available from: https://www.researchgate.net/publication/309550250_Formulacion_de_un_inoculante_multiepecies_para_potenciar_el_crecimiento_de_plantas
- [22]. Morales-García YE. Antagonismo entre bacterias de interés agrícola y evaluación de inoculantes en la promoción del crecimiento del maíz [Internet]. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2013. Available from: <https://sites.google.com/viep.com.mx/jesus-munoz-rojas/tesis-de-doctorado?authuser=0>
- [23]. Corral-Lugo A, Morales-García YE, Pazos-Rojas LA, Ramírez-Valverde A, Martínez-Contreras RD, Muñoz-Rojas J. Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de “Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo.” *Rev Colomb Biotecnol*. 2012;14(2):147–56.
- [24]. 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* [Internet]. 2015;47(4):335–43. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S032575411500125X>
- [25]. Rivera-Urbalejo AP, Rodríguez-Andrade O, Morales-García YE, Quintero-Hernández V, Muñoz-Morales JM, Carbajal-Armenta A, et al. Inoculación de plántulas micropropagadas de caña de azúcar con bacterias benéficas para potenciar su producción. *Alianzas y Tendencias BUAP* [Internet]. 2017;2(7):15–26. Available from: <https://www.aytbuap.mx/publicaciones#h.mxf0hkky313>
- [26]. Molina-Romero D, Baez A, Quintero-Hernández V, Castañeda-Lucio M, Fuentes-Ramírez LE, Bustillos-Cristales M del R, et al.

Compatible bacterial mixture, tolerant to desiccation, improves maize plant growth. PLoS One [Internet]. 2017 Nov 8;12(11):e0187913. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187913>

[27]. Molina-Romero D, Morales-García YE, Hernández-Tenorio A-L, Castañeda-Lucio M, Netzahuatl-Muñoz AR, Muñoz-Rojas J. *Pseudomonas putida* estimula el crecimiento de maíz en función de la temperatura. Rev Iberoam Ciencias. 2017;4(February):80–8.

[28]. Ziedan EHE. Manipulating Endophytic Bacteria for Biological Control to Soil Borne Diseases of Peanut. J Appl Sci Res. 2006;2(8):497–502.

[29]. Khah EM, Passam HC. Sodium hypochlorite concentration, temperature, and seed age influence germination of sweet pepper. HortScience. 2019;27(7):821–3.

[30]. Nelson EB. The seed microbiome: Origins, interactions, and impacts. Plant Soil [Internet]. 2018;422(1):7–34. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3289-7>

[31]. Mangmang JS, Deaker R, Rogers G. Germination characteristics of cucumber influenced by plant growth-promoting rhizobacteria. Int J Veg Sci [Internet]. 2016 Jan 2;22(1):66–75. Available from: <https://doi.org/10.1080/19315260.2014.938850>

[32]. Sabeti M, Tahmasebi P, Ghehsareh Ardestani E, Nikookhah F. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on the seed germination, seedling growth and photosynthetic pigments of *Astragalus caragana* under drought stress. J Rangel Sci [Internet]. 2019;9(4):364–77. Available from: http://www.rangeland.ir/article_663655.html

[33]. Hossain MM, Das K, Yesmin S, Shahriar S. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in seed germination and root-shoot development of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under different salinity condition. Res Agric Livest Fish [Internet]. 2016 May 26;3(1 SE-Agriculture). Available from: <https://www.banglajol.info/index.php/RALF/article/view/27864>

[34]. Kumar R, Shamet GS, Alam NM, Jana C. Influence of growing medium and seed size on germination and seedling growth of *Pinus gerardiana* Wall. Compost Sci Util [Internet]. 2016 Apr 2;24(2):98–104. Available from: <https://doi.org/10.1080/1065657X.2015.1048906>

[35]. Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Ptacek D, Vanderleyden J, Dutto P, et al. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. Funct Plant Biol [Internet]. 2001;28(9):871–9. Available from: <https://doi.org/10.1071/PP01074>

- [36]. Spaepen S, Dobbelaere S, Croonenborghs A, Vanderleyden J. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. Plant Soil [Internet]. 2008;312(1):15–23. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9560-1>
- [37]. Muñoz-Rojas J, Caballero-Mellado J. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. Microb Ecol [Internet]. 2003 Jun 21;46(4):454–64. Available from: <http://www.jstor.org/stable/4251831>
- [38]. Muñoz-Rojas J, Alatorre-Cruz JM, Bustillos-Cristales M del R, Morales-García YE, Hernández-Tenorio A-L, Baez-Rogelio A, et al. Multi-species formulation to improve the growth from plants semi-desertic zones [Internet]. México; MX20150 14278A, 2015. p. 1–28. Available from: https://www.researchgate.net/publication/315800535_Multi-species_formulation_to_improve_the_growth_from_plants_semi-desertic_zones
- [39]. Onofre-Lemus J, Hernández-Lucas I, Girard L, Caballero-Mellado J. ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in *Burkholderia* species, and its growth-promoting effect on tomato plants. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2009 Oct 15;75(20):6581 LP – 6590. Available from: <http://aem.asm.org/content/75/20/6581.abstract>
- [40]. Thomloudi E-E, Tsalgaidou PC, Douka D, Spantidos T-N, Dimou M, Venieraki A, et al. Multistrain versus single-strain plant growth promoting microbial inoculants - The compatibility issue. Hell Plant Prot J [Internet]. 2019;12(2):61–77. Available from: <https://content.sciendo.com/view/journals/hppj/12/2/article-p61.xml>
- [41]. Soumya S, Sreejith S, Shad KS, Anusha P, Swathy B, Renikrishna R, et al. Combined effect of *Pseudomonas* spp. consortium and fertilizer with micronutrients on enhanced yield of *Amaranthus tricolor* (L.). Proc Natl Acad Sci India Sect B - Biol Sci [Internet]. 2020;1–10. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40011-020-01179-x>
- [42]. Muñoz-Rojas J, Morales-García YE, Baez-Rogelio A, Quintero-Hernández V, Rivera-Urbalejo AP, Pérez-y- Terrón R. Métodos económicos para la cuantificación de microorganismos. In: Instituciones de Educación Superior La labor investigadora e innovadora en México [Internet]. Science Associated Editors L.L.C.; 2016. p. 67–82. Available from: https://www.researchgate.net/publication/312067522_Metodos_economicos_para_la_cuantificacion_de_microorganismos

- [43]. Böltner D, Godoy P, Muñoz-Rojas J, Duque E, Moreno-Morillas S, Sánchez L, et al. Rhizoremediation of lindane by root-colonizing *Sphingomonas*. Microb Biotechnol [Internet]. 2008 Jan 1;1(1):87–93. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2007.00004.x>
- [44]. Santiago-Saenz YO, Hernández-Tenorio A-L, Morales-García YE, Quintero-Hernández V, Baez-Rogelio A, Pérez-Santos JLM, et al. Method for obtaining potato plants from the extraction of induced sprouts in controlled conditions. [Internet]. Vol. 2015014804. Mexico; MX 2015014804A, 2017. p. 1–25. Available from: https://www.researchgate.net/publication/320234265_Method_for_obtaining_potato_plants_from_the_extraction_of_induced_sprouts_in_controlled_conditions
- [45]. Li X, Ding C, Zhang T, Wang X. Fungal pathogen accumulation at the expense of plant-beneficial fungi as a consequence of consecutive peanut monoculturing. Soil Biol Biochem [Internet]. 2014;72:11–8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071714000200>
- [46]. Gupta C, Dubey R, Maheshwari D. Plant growth enhancement and suppression of *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut by fluorescent *Pseudomonas*. Biol Fertil Soils [Internet]. 2002;35(6):399–405. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00374-002-0486-0>
- [47]. Blanco Y, Blanch M, Piñón D, Legaz M, Vicente C. Antagonism of *Gluconacetobacter diazotrophicus* (a sugarcane endosymbiont) against *Xanthomonas albilineans* (pathogen) studied in alginate-immobilized sugarcane stalk tissues. J Biosci Bioeng [Internet]. 2005;99(4):366–71. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172305703807>
- [48]. Tortora ML, Díaz-Ricci JC, Pedraza RO. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. Arch Microbiol [Internet]. 2011;193(4):275–86. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0672-7>
- [49]. Caballero-Mellado J, Onofre-Lemus J, Estrada-de los Santos P, Martínez-Aguilar L. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2007 Aug 15;73(16):5308 LP – 5319. Available from: <http://aem.asm.org/content/73/16/5308.abstract>
- [50]. Walsh UF, Morrissey JP, O’Gara F.

Pseudomonas for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2001;12(3):289–95. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166900002123>

[51]. Morales-García YE, Aguilera-Méndez N, Ramírez-Valverde A, Fuentes-Ramírez LE, Ramos JL, Muñoz-Rojas J. Inhibitory substances produced by *Sphingomonas* sp. as strategy of competition. In: 4th International meeting on biotechnology, towards a sustainable bioeconomy Book of

Abstracts BIOTEC2008. Granada, España.; 2008. p. 177.

[52]. Morales-Barrón BM, González-Fernández R, Vázquez-González FJ, De la Mora-Covarrubias A, Quiñonez-Martínez M, Muñoz-Rojas J, et al. Importancia del secretoma de *Bacillus* spp. en el control biológico de hongos fitopatógenos. *Alianzas y Tendencias BUAP* [Internet]. 2019;4(15):36–48. Available from: <https://www.aytbuap.mx/publicaciones#h.9j1e5lid2awk>