



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Facultad de Químico Farmacobiología



Tesis

**Aislamiento de *Azotobacter* sp. y *Burkholderia* sp., su efecto de inoculación en maíz (*Zea mays* L.)
y garbanzo (*Cicer arietinum* L.)**

Tesis que presenta:

Irma Yatziri López Ayala

Para optar el título de:
Químico Farmacobiólogo

Asesor:
Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología
Juan Manuel Sánchez-Yáñez

Laboratorio de Microbiología Ambiental
Instituto de Investigaciones Químico Biológicas

Morelia, Michoacán, septiembre de 2013.

Contenido

1. Resumen	VII
1.1	IX
2. Introducción.....	1
3. Antecedentes.....	2
4. Hipótesis	5
5. Objetivos.....	5
5.1. General	5
5.2. Especifico.....	5
6. Materiales y métodos.....	6
6.1. Origen y aislamiento de los aislados <i>AIYLA1</i> y <i>BIYLA2</i>	6
6.2. Solarización del suelo	7
6.3. Preparación del sistema hidropónico de jarra de Leonard	7
6.4. Desinfección de las semillas de garbanzo y maíz	8
6.5. Inoculación de maíz y garbanzo con los aislados <i>AIYLA1</i> y <i>BIYLA2</i>	9
6.6. Siembra de las semillas de maíz y garbanzo en jarra de Leonard	10
6.7. Conservación de los aislados <i>AIYLA1</i> y <i>BIYLA2</i>	10
6.8. Variables respuesta para analizar el efecto de inoculación de los aislados <i>AIYLA1</i> y <i>BIYLA2</i> en garbanzo y maíz.....	11
6.9. Análisis estadístico de resultados	11
6.10. Identificación de las BPCV de <i>Leucaena</i> sp.	11
6.11. Detección de quistes en el aislado <i>AIYLA1</i>	12
7. Resultados y discusión.....	12
7.1. Evaluación de la inoculación del maíz (<i>Zea mays</i> L.) con <i>Azotobacter</i> sp. <i>AIYLA1</i> y <i>Burkholderia</i> sp. <i>BIYLA2</i>	12
7.2. Evaluación de la inoculación del garbanzo (<i>Cicer arietinum</i> L) con <i>Azotobacter</i> sp. <i>AIYLA 1</i> y <i>Burkholderia</i> sp. <i>BIYLA2</i>	18
7.3. Aislamiento de <i>Azotobacter</i> sp A <i>IYLA 1</i> y <i>Burkholderia</i> sp B <i>IYLA 2</i> en <i>Leucena</i> sp	23
7.4. Formación de quistes en <i>Azotobacter</i> sp. <i>AIYLA1</i>	25
7.5. Resultados de las pruebas bioquímicas API20NE, para identificación de los géneros <i>Azotobacter</i> sp. <i>AIYLA1</i> y <i>Burkholderia</i> sp. <i>BIYLA2</i>	26
8. Conclusión.....	28
9. Literatura citada.....	29

Índice de cuadros

Cuadro 1. Diseño experimental para medir la respuesta de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) y maíz (*Zea mays* L.) a la inoculación con los aislados *AIYLA1* y *BIYLA2*.9

Cuadro 2. Comparación entre el comportamiento bioquímico de *Azotobacter* sp. *AIYLA1* aislada de *Leucaena* sp. y *Azotobacter* spp. reportada en la literatura. 26

Cuadro 3. Comparación entre el comportamiento bioquímico de *Burkholderia* sp. *BIYLA2* aislada de *Leucaena* sp. y *Burkholderia* spp. reportada en la literatura..... 27

Índice de figuras

Figura 1. Preparación del sistema hidropónico de jarra de Leonard.....	8
Figura 2. Siembra de las semillas de maíz y garbanzo en jarra de Leonard.	10
Figura 3. Respuesta de la semilla de maíz (<i>Zea mays</i> L.) a la inoculación con <i>Azotobacter</i> sp. <i>AIYLA1</i> , <i>Burkholderia</i> sp. <i>BIYLA2</i> y la mezcla de ambas en su germinación.....	13
Figura 4. Respuesta del maíz (<i>Zea mays</i> L.) a la inoculación con <i>Azotobacter</i> sp. <i>AIYLA1</i> y <i>Burkholderia</i> sp. <i>BIYLA2</i> y la mezcla de ambas sobre su biomasa a nivel de plántula.	14
Figura 5. Respuesta del maíz (<i>Zea mays</i> L.) a la inoculación con <i>Azotobacter</i> sp. <i>AIYLA1</i> y <i>Burkholderia</i> sp. <i>BIYLA2</i> en su fenotípia a nivel de floración.....	15
Figura 6. Respuesta del maíz (<i>Zea mays</i> L.) a la inoculación con <i>Azotobacter</i> sp. <i>AIYLA1</i> y <i>Burkholderia</i> sp. <i>BIYLA2</i> en su biomasa a nivel de floración.	16
Figura 7. Respuesta del maíz (<i>Zea mays</i> L.) a la inoculación con <i>Azotobacter</i> sp. <i>AIYLA1</i> y <i>Burkholderia</i> sp. <i>BIYLA2</i> en su biomasa a nivel de floración.	17
Figura 8. Respuesta de la semilla de garbanzo (<i>Cicer arietinum</i> L.) a la inoculación con <i>Azotobacter</i> sp. <i>AIYLA1</i> , <i>Burkholderia</i> sp. <i>BIYLA2</i> y la mezcla de ambas sobre su germinación.	18
Figura 9. Respuesta del garbanzo (<i>Cicer arietinum</i> L.) a la inoculación con <i>Azotobacter</i> sp. <i>AIYLA1</i> y <i>Burkholderia</i> sp. <i>BIYLA2</i> en su fenotípia a nivel de plántula.	19
Figura 10. Respuesta del garbanzo (<i>Cicer arietinum</i> L.) a la inoculación con <i>Azotobacter</i> sp. <i>AIYLA1</i> y <i>Burkholderia</i> sp. <i>BIYLA2</i> en su biomasa a nivel de plántula.	20
Figura 11. Respuesta del garbanzo (<i>Cicer arietinum</i> L.) a la inoculación con <i>Azotobacter</i> sp. <i>AIYLA1</i> y <i>Burkholderia</i> sp. <i>BIYLA2</i> y coinoculación con ambas, en su fenotípia a nivel de floración.	21
Figura 12. Respuesta del garbanzo (<i>Cicer arietinum</i> L.) a la inoculación con <i>Azotobacter</i> sp. <i>AIYLA1</i> y <i>Burkholderia</i> sp. <i>BIYLA2</i> y coinoculación con ambas, en su biomasa a nivel de floración.	22
Figura 13. Observación microscópica a 100X de <i>Azotobacter</i> sp. <i>AIYLA1</i> , bacilo Gram negativo, aislada de <i>Leucaena</i> sp. crecida en agar Burk por 30 h/30°C.....	23
Figura 14. Observación microscópica a 100X de <i>Burkholderia</i> sp. <i>BIYLA2</i> , bacilo Gram negativo, aislada de <i>Leucaena</i> sp. crecida en PCAT por 30 h/30°C.	24

Figura 15. Observación microscópica a 100X de quistes en agar Burk en *Azotobacter* sp. AIYLA1, aislada de *Leucaena* sp. en agar Burk con Butanol al 1% por 1 semana/30°C..... 25



Esta investigación fue financiada por el proyecto 2.7 (2013) “Aislamiento y selección de microorganismos promotores de crecimiento vegetal de teocintle y leguminosas silvestres”, con el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH, en el Laboratorio de Microbiología Ambiental, del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, bajo la dirección del Dr. Juan Manuel Sánchez-Yáñez.



“Tesis apoyada por el Consejo Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación del Estado de Michoacán, con número de folio: BT-12-2-573”

1. Resumen

La producción agrícola demanda la utilización de fertilizante nitrogenado (FN), su aplicación en exceso causa la pérdida de la productividad del suelo, por esta razón requiere del empleo de inoculantes a base de géneros bacterianos promotores de crecimiento vegetal (BPCV) como: *Azotobacter* sp. y *Burkholderia* sp., que permiten reducir y optimizar la dosis de FN, sin poner en riesgo el crecimiento sano vegetal. La hipótesis de este trabajo fue que *Azotobacter* sp. y *Burkholderia* sp. aisladas de *Leucaena* sp., una leguminosa silvestre, benefician el crecimiento de maíz y garbanzo a dosis reducida de FN.

Por lo que el objetivo general de este trabajo fue: a) Aislar y seleccionar cepas de *Azotobacter* sp. y *Burkholderia* sp. de la planta *Leucaena* sp., así como analizar el efecto de su coinoculación en plantas de garbanzo y maíz, el objetivo específico fue: a) Evaluar la respuesta del garbanzo y maíz a la coinoculación con *Azotobacter* sp. y *Burkholderia* sp. a dosis de 50% del FN recomendado. El aislamiento de *Azotobacter* sp. y *Burkholderia* sp., se realizó de *Leucaena* sp. Se empleó agar *Pseudomonas cepacia* ácido azelaico y tryptamina (PCAT) para aislar *Burkholderia* sp. y agar Burk para la recuperación de *Azotobacter* sp. Estas BPCV se inocularon en garbanzo y maíz y se sembraron en jarras de Leonard, bajo un diseño experimental de bloques al azar. El maíz y garbanzo inoculados con *Azotobacter* sp. *AIYLA1* y *Burkholderia* sp. *BIYLA2* se alimentaron con solución mineral (SM) con N en forma de NH_4NO_3 al 50% de su concentración.

Mientras la misma gramínea y leguminosa sin inocular se utilizó como control relativo, ambas plantas se alimentaron con SMC con el NH_4NO_3 al 100% de dosis recomendada para cada planta. El garbanzo y el maíz sin inocular que se emplearon como control absoluto, se irrigaron solo con agua. Las variables respuestas para medir el efecto de BPCV en las dos plantas fueron: el por ciento de

germinación (%), la fenotípia aérea y radical: altura de la planta, longitud de raíz y la biomasa: peso fresco y seco de parte aérea y radical, los resultados se analizaron por la prueba estadística de Tukey.

Los resultados señalan que el porcentaje de germinación del maíz y garbanzo coinoculado con *Azotobacter* sp. *AIYLA1* y *Burkholderia* sp. *BIYLA2* fue de 95%, estadísticamente diferente comparado con su homólogo no inoculado usado como control relativo (CR) con un 85%. A nivel de plántula, el maíz coinoculado con *Azotobacter* sp. *AIYLA1* y *Burkholderia* sp. *BIYLA2* mostro una respuesta positiva en su peso aéreo (PSA) con 2.56 g, estadísticamente distinto comparado con la misma gramínea sin inocular usada como CR con 0.84 g de PSA. A nivel de floración, el maíz coinoculado con ambas BPCV alcanzó 7.03 g de peso seco radical (PSR), significativamente diferente comparado con 2.60 g de PSR de la misma gramínea sin inocular empleada como CR. A nivel de plántula, el garbanzo coinoculado con los dos géneros de BPCV, tuvo una longitud radical (LR) de 31.85 cm, estadísticamente distinta comparada con la LR de su homólogo sin inocular usado como CR con 23.85 cm de LR. A nivel de floración, la respuesta del garbanzo coinoculado con las BPCV causó un PST de 0.82 g, estadísticamente diferente comparado con el mismo garbanzo sin inocular usado como CR con 0.71 g de PST.

Se concluyó que *Leucaena* sp., es una fuente de BPCV como *Azotobacter* sp. y *Burkholderia* sp. para plantas domésticas como: garbanzo y maíz; las que tuvieron una respuesta positiva a la coinoculación con los dos géneros bacterianos, alimentadas con una dosis de FN al 50%, inferior a lo recomendado para cada una, lo que sugiere una interacción sinérgica de tipo metabólica de los dos géneros de BPCV, a favor del garbanzo y maíz.

Palabras claves: agricultura, colonización, rizósfera.

1.1 Abstract

Agricultural production demand the use of nitrogen fertilizer (NF), its application in excess causes loss of soil productivity, therefore requires the use of inoculants bacterial based plant growth promoting bacteria (PGPB) as *Azotobacter* sp. and *Burkholderia* sp., which can reduce and optimize the dose of NF, without jeopardizing healthy plant growth. The hypothesis of this study was to *Azotobacter* sp. and *Burkholderia* sp. isolated from *Leucaena* sp., a legume wild growth benefit corn and chickpea reduced dose of NF.

So the overall objective of this work were: a) Isolate and select strains of *Azotobacter* sp. and *Burkholderia* sp. plant *Leucaena* sp., and analyze the effect of co-inoculation in chickpea and corn plants, the specific objective was: a) evaluate the response of chickpea and corn co-inoculation with *Azotobacter* sp. and *Burkholderia* sp. at doses of 50 % of NF recommended . Isolation of *Azotobacter* sp. and *Burkholderia* sp. , was held *Leucaena* sp. Agar was employed *Pseudomonas cepacia* azelaic acid tryptamine (PCAT) to isolate *Burkholderia* sp. and Burk agar to recover *Azotobacter* sp. These PGPR were inoculated chickpea and corn and planted in Leonard jars under an experimental design of randomized blocks. Corn and pea inoculated with *Azotobacter* sp. AIYLA1 and *Burkholderia* sp. BIYLA2 fed mineral solution (MS) with N NH_4NO_3 as 50% of its concentration.

While it uninoculated grass-legume used as a relative control, both plants were fed with NH_4NO_3 CSM 100% recommended dose for each plant. The chickpea and uninoculated corn that were used as absolute control, were irrigated with water only. The response variables to measure the effect of PGPB on both floors were the percent germination (%), the shoot and root phenotyping: plant height, root length and biomass: fresh and dry weight of shoot and radical , the results were analyzed by Tukey statistical test.

The results indicate that the percentage of germination of corn and chickpea coinoculated with *Azotobacter* sp. AIYLA1 and *Burkholderia* sp. BIYLA2 was 95 %, statistically different compared with its counterpart used as a relative control uninoculated (RC) with 85 % . A level of seedling corn coinoculated with *Azotobacter* sp. AIYLA1 and *Burkholderia* sp. BIYLA2 showed a positive response in shoot dry weight (SDW) with 2.56 g statistically different compared with the same grass used as CR uninoculated with 0.84 g of SDW. At flowering, corn PGPB coinoculated with both reached 7.03 g root dry weight (RDW), significantly different compared to 2.60 g of the same grass RDW uninoculated employed as RC. A seedling level , chickpea coinoculated with two genera of PGPB, had a root length (RL) of 31.85 cm, statistically different compared with its counterpart RL uninoculated used as RC had 23.85 cm RL. At flowering, chickpea response coinoculated with PGPB caused total dry weight (TDW) 0.82 g, statistically different compared with the same non-inoculated chickpea used as CR with 0.71 g of TDW.

Concluded that *Leucaena* sp. is a source PGPB as *Azotobacter* sp. and *Burkholderia* sp. for domestic plants such as peas and corn which had a positive response to co-inoculation with both bacterial genera, fed a dose of NF to 50 % less than recommended for each, suggesting a synergistic interaction type metabolic two genera of PGPB, in favor of chickpea and corn.

Keywords : agriculture , colonization, rhizosphere.

2. Introducción

El maíz (*Zea mays* L.) es el cereal más importante después del trigo en el comercio mundial. En México es materia prima de una amplia variedad de productos para el consumo humano, industrial y forraje para animales (Martínez *et al.*, 2011).

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es la segunda leguminosa de grano de importancia en el mundo, se cultiva por sus propiedades alimenticias de su fruto y la planta tierna o seca es valiosa como forraje (Cutíño-Escalona *et al.*, 2012).

El garbanzo y el maíz demandan fertilizante nitrogenado (FN), el que aplicado en exceso causa la pérdida de productividad del suelo; una alternativa para evitar la hiperfertilización del FN, en el cultivo de ambas plantas es la inoculación de sus semillas con géneros de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV), que permiten una regulación y/o disminución de la dosis de FN sin afectar negativamente su crecimiento y no causar contaminación ambiental (Armenta *et al.*, 2010).

En la agricultura se practica la inoculación del garbanzo con *Rhizobium* sp. y el maíz con *Azospirillum* sp. (Camelo *et al.*, 2011); en ocasiones esta práctica con géneros de plantas domésticas no tiene respuesta positiva en los vegetales en los que se inoculan, por lo tanto se buscan otros géneros de BPCV que provengan de plantas silvestres de ambientes estresados, donde se emplea la inoculación, pues podrían ser efectivas porque están mejor adaptadas a problemas de deficiencia nutricional y son afines a los cultivos agrícolas (Armenta *et al.*, 2010).

El género de la leguminosa silvestre *Leucaena* sp. puede ser una fuente para el aislamiento de BPCV (Hernández *et al.*, 2012), es una forrajera con una elevada calidad nutricional, con una amplia capacidad de adaptación a distintos climas, suelos y una alta producción por unidad de área (Camacaro *et al.*, 2004).

Azotobacter sp. es un bacilo Gram negativo, cosmopolita, que se ha aislado de avena (*Avena sativa* L.), cebada (*Hordeum vulgare* L.), maíz (*Zea mays* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.) y de la raíz de teocintle (*Zea mays* sp. *mexicana* L.). Además en la literatura, se ha reportado que *Azotobacter chroococcum* existe en asociación con el sistema radical del garbanzo, mientras que *A. beijerinckii* se relaciona con las raíces de gramíneas como: maíz; ambas especies de *Azotobacter* estimulan el crecimiento vegetal, mediante la conversión de exudados de semilla y radicales en SPCV, que inducen la proliferación de esos pelos radicales, con ello mejora la absorción radical del FN a dosis inferiores a lo recomendado para estos vegetales (Díaz *et al.*, 2000).

Mientras que las especies de *Burkholderia unamae*, *B. tropica* y *B. silvatlantica* se han aislado de maíz y caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), *B. vietnamiensis* en asociación endófito con maíz y sorgo (*Sorghum vulgare* L.). Además *Burkholderia* sp. como endófito, interacciona con los tejidos vegetales y permite racionalizar la aplicación de FN en maíz, dado que se sugiere que utiliza sus exudados radicales y los convierte en SPCV, las que inducen la proliferación de raíces secundarias y aumentan la absorción del FN a dosis inferior sin riesgo en su sano crecimiento y/o su rendimiento (Mora y Toro, 2007).

3. Antecedentes

García-Reyna *et al.*, 2005, con el objetivo de analizar la respuesta del maíz a la inoculación con *Burkholderia* sp. Realizaron un experimento donde: la gramínea inoculada con *Burkholderia* sp., y su homólogo sin inocular usado como control relativo (CR) alimentado con una dosis al 100% de FN, con veinte repeticiones. Los resultados mostraron que: el maíz inoculado con *Burkholderia* sp. aumentó en un 47% su peso seco radical

(PSR), así como un incremento del peso seco del tallo en un 57%, comparado con el 25% en su PSR, 39% en el peso seco del tallo de su homólogo sin inocular usado como CR con la dosis del FN recomendado.

Mora y Toro, 2007, evaluaron la respuesta del maíz a la inoculación con *Burkholderia cepacia*, en invernadero. Bajo un diseño experimental en donde la gramínea se inoculó con *B. cepacia* y el mismo cereal sin inocular empleado como CR con cinco repeticiones. Los resultados mostraron que: el maíz con *B. cepacia* alcanzó un 100% en su germinación, 0.42 g en su biomasa total y 7.48 cm en su longitud radical (LR), comparados con los mismos parámetros en el maíz no inoculado utilizado como CR, que tuvo un 71% en su germinación, en tanto que su biomasa total fue de 0.27 g y 5.47 cm en su LR.

Reyes *et al.*, 2008, analizaron la respuesta del maíz a la inoculación con *Azotobacter* sp. en campo. Emplearon un diseño experimental en el que: la gramínea con *Azotobacter* sp. y sin tratar usada como CR con cinco repeticiones. Los resultados mostraron: que el maíz con *Azotobacter* sp., alcanzó un 77% de porcentaje de germinación, en contraste con un 71% en su germinación, del mismo cereal sin inocular empleado como CR; mientras que el maíz con *Azotobacter* sp. en su peso seco (PS) tuvo 6.86 g, valor sin diferencia estadística con la gramínea empleada como CR con 7.59 g de PS.

Aguirre-Medina *et al.*, 2009, estudiaron la respuesta del maíz a la inoculación con *Burkholderia phytofirmans*. Con un diseño experimental en donde el maíz se trató con *B. phytofirmans*, la misma gramínea con *Enterobacter cloacae*; este cereal con *Stenotrophomonas maltophilia*, con *Pseudomonas putida*; con *Stenotrophomonas canadense* y con inoculación mixta y sin inocular usado como control absoluto (CA), con seis repeticiones. Los resultados indicaron que: el maíz coinoculado, tuvo un aumento del 28% en su peso seco aéreo (PSA) y registró un aumento del 20% en su peso seco radical (PSR) en comparación con un 13% en su PSA y 10% en su PSR del maíz sin inocular, usado como CA.

Hernández-Rodríguez en el 2010, analizó la respuesta del maíz a la inoculación con *Burkholderia cepacia*, a nivel de campo. Bajo el diseño experimental siguiente: la gramínea sin inocular usada como CA, el homólogo

inoculado con *B. cepacia* con cinco repeticiones. Los resultados mostraron que: el maíz inoculado con *B. cepacia* registró un 100% en su germinación, alcanzó 0.45 g en su peso fresco aéreo (PFA) y un peso fresco radical (PFR) de 0.49 g, estadísticamente significativo en comparación con la misma gramínea sin inocular que alcanzó un 95% en su porcentaje de germinación, su PFA fue de 0.30 g y registró un PFR de 0.32 g.

Piromyou *et al.*, 2011, reportaron la respuesta positiva del maíz a la inoculación con *Azotobacter* sp. Mediante un experimento en invernadero con el siguiente diseño experimental: la gramínea inoculada con *Azotobacter* sp., el mismo maíz con *Azospirillum* sp. y la planta sin inocular como CA con tres repeticiones. Los resultados señalaron que: el maíz con *Azotobacter* sp. incremento en un 45% su PSA y su PSR en un 30.7% comparado con la misma gramínea no inoculada empleada como CR con un aumento del 43% en PSA y 15.3% en su PSR.

Cutiño-Escalona *et al.*, 2012, con el objetivo de analizar la respuesta del garbanzo a la inoculación con *A. chroococcum*. Realizaron el siguiente diseño experimental: la leguminosa inoculada con una cepa comercial de *A. chroococcum*; inoculado con *A. chroococcum* nativa y su leguminosa sin inocular usado como CR con ocho repeticiones. Los resultados mostraron que: el garbanzo con *A. chroococcum*, alcanzó un 100% de germinación, con tres días de emergencia, su altura de planta (AP) alcanzó 38.3 cm, con 4.3 cm de diámetro de su tallo y 35.1 cm de LR, estos valores fenológicos fueron estadísticamente diferentes superiores comparados con el garbanzo sin inocular usado como CR con 81% de porcentaje de germinación, con cuatro días a emergencia y 31 cm en su AP, el diámetro de su tallo fue de 3.0 cm y su LR de 29.1 cm. Mientras que la biomasa en el garbanzo con *A. chroococcum*, alcanzó 13.53 g en su PFA, 2.16 g de PFR, en su PSA registró 4.4 g y un PSR de 1.5 g, estadísticamente diferentes significativos comparados con el garbanzo sin inocular usado como CR con 9.83 g en su PFA, alcanzó 1.53 g de PFR, su PSA registró 3.7 g y tuvo un PSR de 0.6 g.

González-Leyva *et al.*, 2012, con el objetivo de analizar la respuesta del garbanzo a la inoculación con *Azotobacter chroococcum*. Emplearon un diseño experimental: el garbanzo inoculado con *A. chroococcum*, la misma leguminosa con *Penicillium billiai*, el homólogo inoculado con *Mesorhizobium cicerii* y el garbanzo sin inocular usado como CA con diez repeticiones. Los resultados indicaron que: el garbanzo con *A. chroococcum* registró 28 cm de su AP, alcanzó un diámetro del tallo de 2.58 mm y 27.8 cm de su LR; respecto a su biomasa, registró un PFA de 16.7 g, tuvo un PFR de 3.0 g, su PSA fue de 4.2 g y su PSR fue de 0.6 g, esta respuesta positiva del garbanzo fue estadísticamente superior significativo comparado con su homólogo sin inocular usado como CA con una AP de 24.6 cm, registró un diámetro en su tallo de 2.0 mm, alcanzó 26.3 cm de su LR, tuvo un PFA de 14.3 g, su PFR fue de 2.2 g, 3.1 g en su PSA y en su PSR registró 0.4 g.

4. Hipótesis

La coinoculación de cepas de *Azotobacter* sp. y *Burkholderia* sp. aisladas de la leguminosa silvestre *Leucaena* sp., benefician el crecimiento de maíz y garbanzo a dosis reducida de FN.

5. Objetivos

5.1. General

- a) Aislar y seleccionar cepas de *Azotobacter* sp. y *Burkholderia* sp. de la planta *Leucaena* sp., así como analizar el efecto de su coinoculación en plantas de garbanzo y maíz.

5.2. Especifico

- b) Evaluar la respuesta del garbanzo y maíz a la coinoculación con *Azotobacter* sp. y *Burkholderia* sp. a dosis de 50% del N recomendado.ç

6. Materiales y métodos

6.1. Origen y aislamiento de los aislados *AIYLA1* y *BIYLA2*

Los aislados de *AIYLA1* y *BIYLA2* se aislaron de raíces de *Leucaena* sp., cultivada durante 45 días en macetas con suelo laterítico sódico pobre en materia orgánica y N mineral de Morelia, Mich., en invernadero en el laboratorio de Microbiología Ambiental del IIQB de la UMSNH. La raíz de *Leucaena* sp. se colectó, se eliminó el suelo y se lavó con agua potable; en campana de flujo laminar se realizó el corte de 5 cm de la parte radical con tijeras desinfectadas con Hipoclorito de sodio al 3% (v/v) y Alcohol al 70% (v/v); luego la raíz se desinfectó con Cloro al 3% (v/v)/5 min y se lavó seis veces con agua potable estéril, después con Alcohol al 70% (v/v)/5 min y se lavó seis veces con agua estéril; luego 2 cm de la raíz se suspendió en 5 mL de solución salina NaCl 0.85% (p/v) en mortero estéril, donde se trituró, y con una aza bacteriológica se tomó una muestra y se sembró en caldo Burk (g/L): glucosa 10.0; K₂HPO₄ 2.0; KH₂PO₄ 2.0; MgSO₄ 3.0; y una solución de oligoelementos 1 mL/L de medio de cultivo, con la siguiente composición (g/L): H₃BO₃ 2.86; ZnSO₄ 7H₂O 0.22; MnCl₂ 7H₂O 1.81; K₂MnO₄ 0.09 a pH 6.4-6.7; azul de bromotimol 1% (p/v) 10 mL/L de medio de cultivo, se ajustó a pH 6.5-6.7 para *Azotobacter* sp.; se inhibió el crecimiento de hongos con el antifúngico Tecto 60® (Syngenta) 2% (p/v) 1.0 mL/L de medio de cultivo y en el caldo PCAT: *Pseudomonas cepacia* ácido azaleico y triptamina (g/L): triptamina 0.2 (se disolvió en un tubo de ensaye con 2 mL de Alcohol al 70%); ácido azaleico 2.0 (se disolvió en un tubo de ensaye con 2 mL de Alcohol al 70%); K₂HPO₄ 4.0; KH₂PO₄ 4.0; extracto de levadura 0.02; MgSO₄ 0.2 a pH 6-6.5 para *Burkholderia* sp.; se evitó el crecimiento de hongos con el antifúngico Tecto 60® (Syngenta) 2% (p/v) 1.0 mL/L de medio de cultivo, los tubos de PCAT y Burk se incubaron a 30°C/24 h, se observó turbidez como medida de crecimiento y se realizó tinción Gram para observar en el microscopio Carl Zeiss, su morfología: bacilo corto y grande Gram negativo; para su purificación a la misma fórmula líquida de Burk, se le agregó 18

g/L de agar bacteriológico; a la base del caldo PCAT, se le adicionó 15 g/L de agar bacteriológico, se incubaron a 30°C/48-72 h, luego se realizó tinción Gram para observar un bacilo grande sospechoso para *Azotobacter* sp. y un bacilo corto o cocobacilo para posible *Burkholderia* sp., ambos Gram negativos (Sánchez-Yáñez, 2007).

6.2. Solarización del suelo

Se solarizaron 60 Kg de suelo laterítico sódico pobre en materia orgánica y N mineral, por acción del calor solar para eliminación de fitopatógenos, plagas y enfermedades. El suelo se colocó sobre un plástico oscuro y se tapó con otro negro, el día siguiente, se regó con agua potable y se tapó de nuevo con el plástico negro y el tercer día, se destapó y uso el suelo para el llenado de las jarras de Leonard (Ramírez y Sáinz, 1995).

6.3. Preparación del sistema hidropónico de jarra de Leonard

La medición de la respuesta del garbanzo y maíz a la inoculación con los aislados *AIYLA1* y *BIYLA2*, se estableció en invernadero en un sistema hidropónico de jarras de Leonard constituido por: la parte superior de la botella de PET donde se colocó 1.5 kg de suelo, conectado con algodón para su movimiento por capilaridad a través del suelo desde la base, a la parte inferior de botella de PET que contenía el agua y/o la SMC, con la siguiente composición (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 12.0; KH_2PO_4 3.0; K_2HPO_4 3.5; MgSO_4 1.5; CaCl_2 0.1; FeSO_4 0.5 mL/L; solución de oligoelementos 1.5 mL/L de SMC ajustada a pH 6.8-7.0 y SM al 50% de N en forma de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que alimento al garbanzo y maíz, como se muestra en la Figura 1 (Luna y Sánchez-Yáñez, 1995).



1a) Corte de la parte superior e inferior de la botella de PET.

1b) Colocación del algodón en la parte superior de la botella de PET para su armado.

1c) Adición de suelo en la parte superior de la botella de PET.

1d) Adición de la SM ó agua en la parte inferior de la botella de PET.

Figura 1. Preparación del sistema hidropónico de jarra de Leonard.

6.4. Desinfección de las semillas de garbanzo y maíz

En un vaso de precipitado se sumergieron las semillas de garbanzo y maíz en Cloro al 3% (v/v)/5 min, se lavaron seis veces con agua potable estéril, se colocaron en Alcohol al 70% (v/v)/5 min y se lavaron seis veces con agua estéril (Garcia-Reyna *et al.*, 2005).

En el Cuadro 1, se indica el diseño experimental empleado para analizar la respuesta del garbanzo y maíz a la inoculación con los aislados *AIYLA1* y *BIYLA2*: el garbanzo inoculado con *AIYLA1*, tratado con *BIYLA2*, coinoculado con ambas BPCV alimentados con la dosis de SM con N al 50% y su homólogo sin inocular usado como CR alimentado con una dosis de SM con N al 100%. El maíz inoculado con *AIYLA1*, la misma gramínea inoculada con *BIYLA2* y con inoculación mixta alimentados con la dosis de SM al 50% de N y el mismo cereal sin inocular usado como CR alimentado con una dosis de SM al 100% de N, con cinco repeticiones.

Cuadro 1. Diseño experimental para medir la respuesta de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) y maíz (*Zea mays* L.) a la inoculación con los aislados *AIYLA1* y *BIYLA2*.

Tratamiento	Garbanzo	Maíz	Aislado <i>AIYLA1</i>	Aislado <i>BIYLA2</i>	Solución mineral con N como NH_4NO_3 al 100%	Solución mineral con N como NH_4NO_3 al 50%	Agua
Control absoluto	+	+	–	–	–	–	+
Control relativo	+	+	–	–	+	–	–
I	–	+	–	+	–	+	–
II	+	–	–	+	–	+	–
III	–	+	+	–	–	+	–
IV	+	–	+	–	–	+	–
V	–	+	+	+	–	+	–
VI	+	–	+	+	–	+	–

* + = se aplico, - = No se aplico

6.5. Inoculación de maíz y garbanzo con los aislados *AIYLA1* y *BIYLA2*

En la campana de flujo laminar, con una pinza desinfectada con Cloro al 3% (v/v) y Alcohol al 70% (v/v), se depositaron en una bolsa de plástico obscura, 20 semillas de garbanzo y maíz que se utilizaron por cada tratamiento, con una pipeta estéril se inoculo por cada 10 semillas, un volumen de 1.0 ml con los aislados *AIYLA1* y *BIYLA2*, ambos cultivados en caldo Burk y PCAT por 48 y 24 hr respectivamente y se mezclaron/20 minutos (Garcia-Reyna *et al.*, 2005).

6.6. Siembra de las semillas de maíz y garbanzo en jarra de Leonard

Se sembraron 4 semillas por jarra de Leonard y se etiquetaron de acuerdo con su tratamiento, se cubrió con papel la parte del contenedor con agua o SMC/reducida al 50% del N, como se ilustra en la Figura 2 (Garcia-Reyna *et al.*, 2005).



2a) Siembra de las semillas en jarra de Leonard

2b) Etiquetar y cubrir la parte de abajo de las botellas de PET.

Figura 2. Siembra de las semillas de maíz y garbanzo en jarra de Leonard.

6.7. Conservación de los aislados *AIYLA1* y *BIYLA2*

En viales con 1.0 g de silosil estéril, se agregó con una pipeta estéril, 1 mL de la suspensión de la cepa pura de los aislados *AIYLA1* y *BIYLA2*, se realizaron tres repeticiones (Sánchez-Yáñez *et al.*, 2007), se guardaron en la colección de BPCV del Laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH.

6.8. Variables respuesta para analizar el efecto de inoculación de los aislados *AIYLA1* y *BIYLA2* en garbanzo y maíz

El porcentaje (%) de germinación de semillas de garbanzo y maíz se determinó a los 11 días. Luego se realizó el aclareo de las plantas, se dejaron solo dos por jarra de Leonard y se llevaron al invernadero. En el estado de plántula a los 32 días después de la siembra y en floración a los 62 días posteriores a su siembra, se midió la fenotípica aérea y radical en garbanzo y maíz: se realizó el corte radical y parte aérea. Para la biomasa: se obtuvo el peso fresco de parte aérea y radical, posteriormente ambas partes se secaron en horno a 40°C/48 h y se midió el peso seco de parte aérea y radical (García-González *et al.*, 2005).

6.9. Análisis estadístico de resultados

El análisis de la respuesta del garbanzo y maíz a la inoculación y coinoculación con los aislados *AIYLA1* y *BIYLA2*, se determinó por el método de Tukey (Garcia *et al.*, 2001).

6.10. Identificación de las BPCV de *Leucaena* sp.

Se identificaron los aislados de *AIYLA1* y *BIYLA2* mediante un ensayo bioquímico con API20NE, un sistema de identificación para bacterias Gram negativas, que consta de 21 pruebas bioquímicas: reducción de nitrato, triptófano, fermentación de glucosa, arginina dehidrolasa, ureasa, hidrólisis de esculina, gelatinasa, β -galactosidasa, D-glucosa, L-arabinosa, D-manosa, D-manitol, N-acetil-D-glucosamina, maltosa, D-gluconato, caprato, adipato, L-malato, citrato, fenilacetato. Para lo cual se sembraron los aislados sospechosos de *AIYLA1* y *BIYLA2* en caldo Burk y PCAT. Se tomó una asada de los tubos/cajas de cada aislado y se suspendió en 5.0 mL de solución salina (NaCl 0.85% p/v). Los

tubos se agitaron a 200 rpm/48 h. Posteriormente se tomó 0.1 mL de la suspensión de solución salina de cada aislado y se sembró en los microtubos de API20NE, se incubaron/48 h a 32°C, para registrar los resultados (Salazar *et al.*, 2008).

6.11. Detección de quistes en el aislado *AIYLA1*

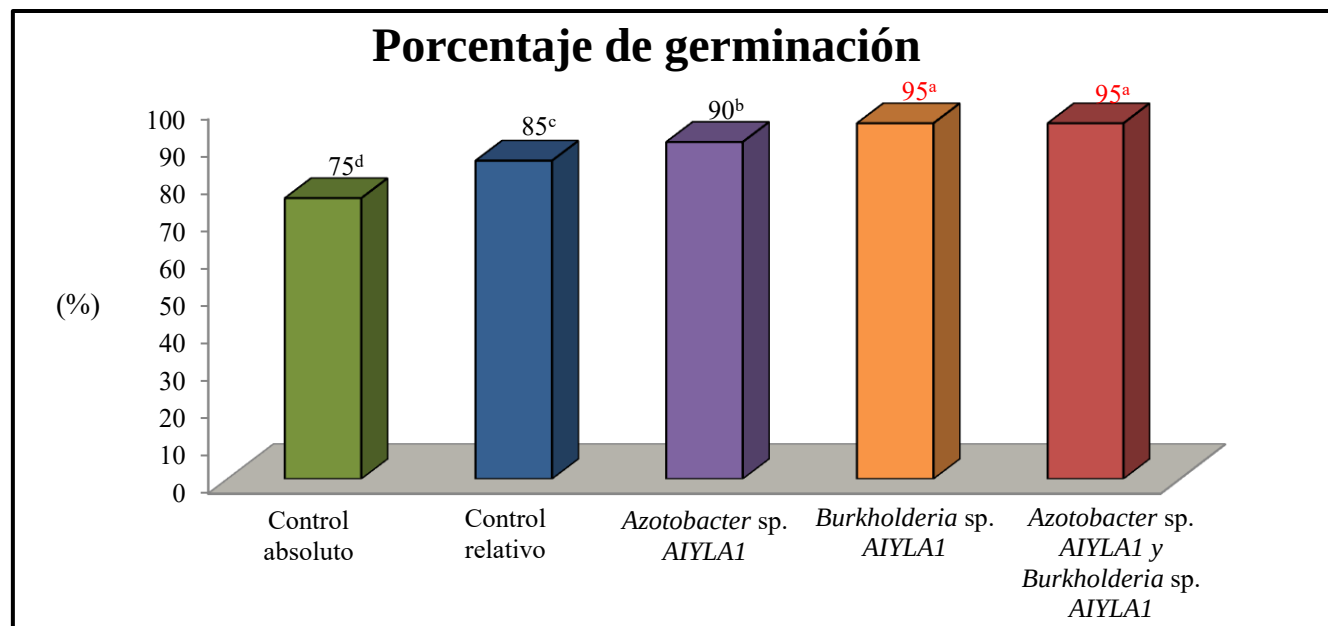
Se sembró el aislado *AIYLA1* en agar Burk con alcohol butílico (g/L): alcohol butílico 1% (v/v) 10.0 mL/L; K₂HPO₄ 2.0; KH₂PO₄ 2.0; MgSO₄ 3.0; solución de oligoelementos 1 mL/L; azul de bromotimol 1% 10 mL/L; agar 18; a pH 6.5-6.7; para evitar el crecimiento de hongos se agregó Tecto 60® (Syngenta) 2% (p/v) 1 mL/L, se incubó a 30°C/1 semana, posteriormente se realizó una tinción para observar en el microscopio Carl Zeiss, la formación de los quistes: se colocó una asada del cultivo en portaobjeto y se le agregaron 2 gotas de yodo lugol/1 min, se lavó y se observó su existencia (Escobar *et al.*, 2011).

7. Resultados y discusión

7.1. Evaluación de la inoculación del maíz (*Zea mays* L.) con *Azotobacter* sp. *AIYLA1* y *Burkholderia* sp. *BIYLA2*

En la Figura 3, se muestra que el % de germinación de la semilla de maíz inoculada con *Burkholderia* sp. *BIYLA2* alcanzo un 95%, mientras que coinoculada con *Azotobacter* sp. *AIYLA1* y *Burkholderia* sp. *BIYLA2* fue de 95%, a dosis reducida al 50% de FN, estos valores fueron estadísticamente superiores al 85% de la homologa sin inocular alimentada con una dosis al 100% de FN, lo anterior sugiere que ambas BPCV convirtieron los exudados de la espermosfera de la semilla en SPCV, que terminaron con la latencia del embrión y aceleraron su velocidad de germinación del maíz (Arellano, *et al.*, 2008).

Figura 3. Respuesta de la semilla de maíz (*Zea mays* L.) a la inoculación con *Azotobacter* sp. *AIYLA1*, *Burkholderia* sp. *BIYLA2* y la mezcla de ambas en su germinación.

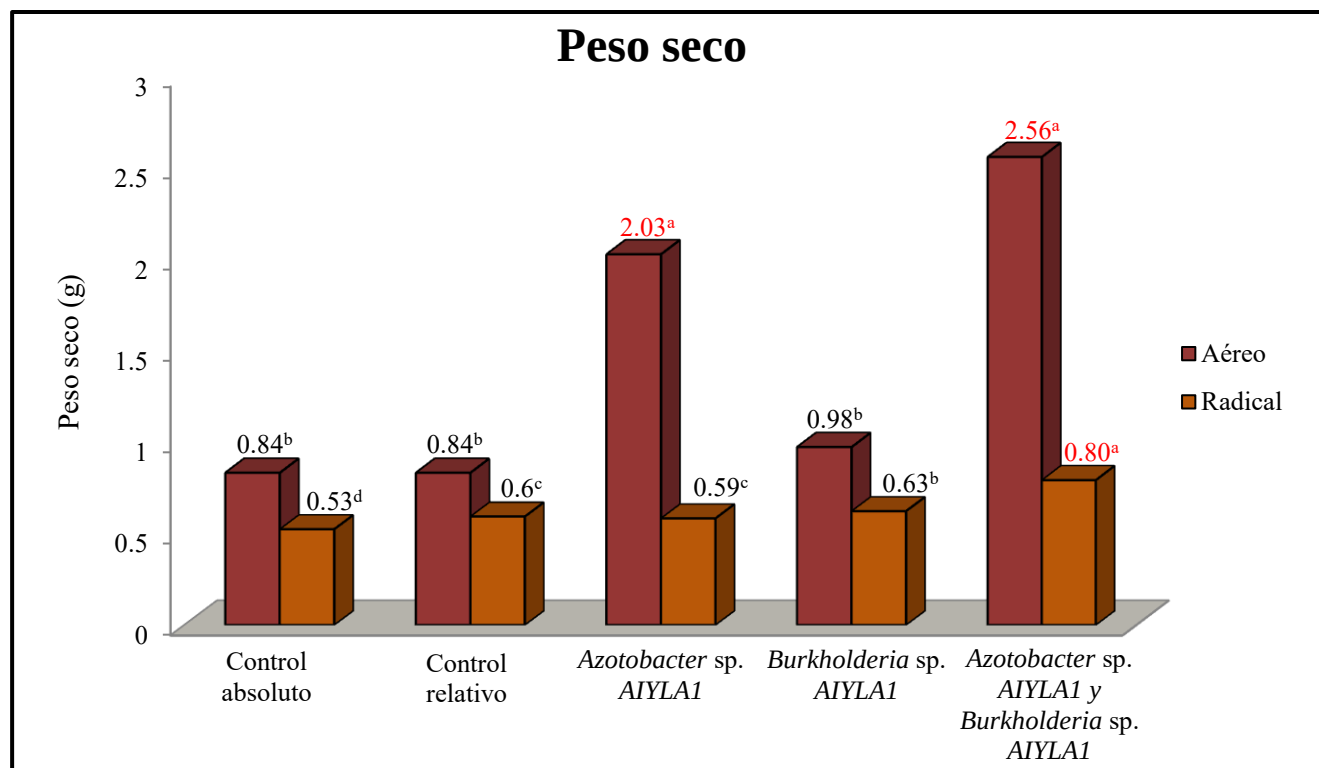


*Valores con letras distintas con diferencia estadística ($P < 0.05$) según Tukey.

En la Figura 4, se muestra la respuesta del maíz inoculado con *Azotobacter* sp. *AIYLA1* que indujo un PSA de 2.03 g, en tanto que en el coinoculado con las dos BPCV, registro 2.56 g de PSA, ambos con la dosis al 50% del FN, ambos valores fueron estadísticamente significativos distintos al maíz sin inocular usado como CR con 0.84 g y al tratado con *Burkholderia* sp. *BIYLA2* con un PSA de 0.98 g, lo que sugiere que los dos géneros transformaron las excreciones radicales de la gramínea en SPCV y en consecuencia hubo una mayor absorción mineral y con ello un aumento en el PFA (Piromyou *et al.*, 2011). Mientras que el maíz coinoculado con las dos BPCV con la dosis de FN al 50%, registro un PSR de 0.80 g, lo que fue estadísticamente significativo diferente comparado con 0.60 g de PSR del mismo cereal sin inocular empleado como CR y con el tratado con *Azotobacter* sp. *AIYLA1* que fue de 0.59 g de PSR, lo que sugiere que estas BPCV convirtieron los exudados de raíz del maíz en SPCV, *Azotobacter* sp. favoreció la entrada de *Burkholderia* sp. en tejidos de esa parte de la planta para una

mayor absorción de minerales que incremento la longitud y número de raíces secundarias de la gramínea (Cutíño-Escalona, 2012).

Figura 4. Respuesta del maíz (*Zea mays* L.) a la inoculación con *Azotobacter* sp. *AIYLA1* y *Burkholderia* sp. *BIYLA2* y la mezcla de ambas sobre su biomasa a nivel de plántula.

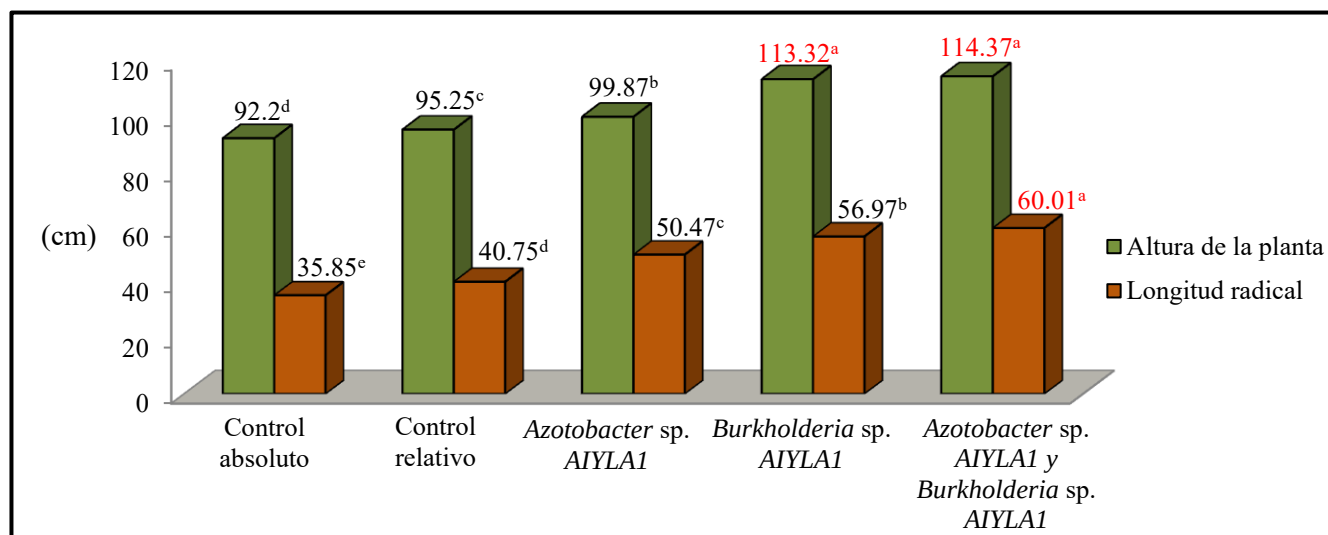


*Valores con diferentes letras con diferencia estadística ($P < 0.05$) según Tukey.

En la Figura 5, a nivel de floración, se muestra la respuesta del maíz inoculado con *Burkholderia* sp. *BIYLA2* en su AP con 113.32 cm, mientras que el coinoculado con ambas fue de 114.37 cm con el 50% del FN, recomendado para esta gramínea; ambos valores fueron estadísticamente diferentes significativos comparados con el maíz usado como CR con 95.25 cm de AP; lo anterior sugiere que los dos géneros de BPCV transformaron sus exudados radicales en SPCV, las que indujeron una mayor formación de tallos (Camelo *et al.*, 2011). El maíz coinoculado con el 50% del FN, registro 60.01 cm en su LR, esta respuesta positiva fue estadísticamente diferente significativa comparada con la misma

gramínea sin inocular usada como CR con 40.75 cm en su LR; lo anterior sugiere que *Azotobacter* sp. al utilizar los exudados radicales del maíz en asociación con *Burkholderia* sp. los convirtieron en SPCV, que indujeron la formación de abundantes pelos radicales en la zona meristemática del garbanzo, lo que aumento la elongación de la raíz de la leguminosa (Martinez *et al.* 2011).

Figura 5. Respuesta del maíz (*Zea mays* L.) a la inoculación con *Azotobacter* sp. AIYLA1 y *Burkholderia* sp. BIYLA2 en su fenotípia a nivel de floración.

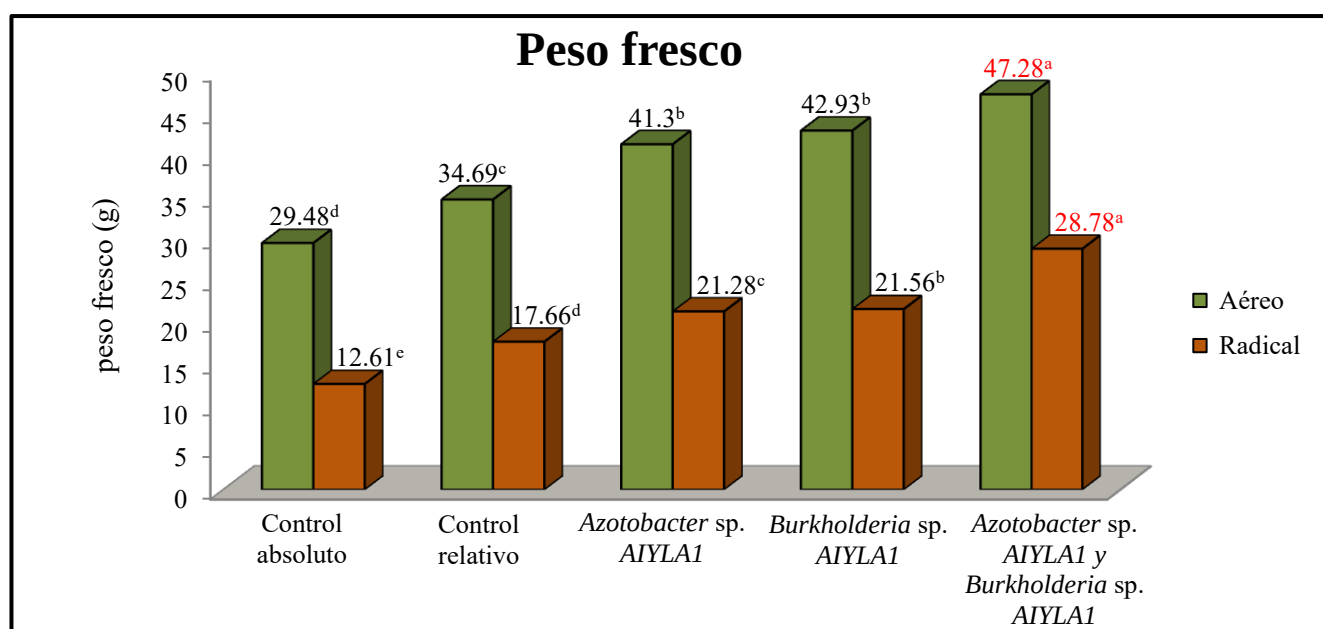


*Valores con diferentes letras con diferencia estadística ($P < 0.05$) según Tukey.

En la Figura 6, a nivel de floración, se muestra la respuesta del maíz a la doble inoculación con *Azotobacter* sp. AIYLA1 y *Burkholderia* sp. BIYLA 2 en su PFA que alcanzo 47.28 g, con dosis al 50% del FN, de lo recomendado para esta gramínea, el valor señalado fue estadísticamente significativo comparado con la misma gramínea sin inocular usada como CR con 34.69 g de PFA, lo anterior sugiere que ambos géneros tuvieron la capacidad de utilizar compuestos orgánicos de la raíz del maíz y los convirtieron en SPCV, con lo que hubo un aumento en el crecimiento de la raíz y *Burkholderia* sp. como endófita mejoro la capacidad de absorción radical de minerales e influyo en el crecimiento del tallo, del número de hojas y de esa forma un mayor PFA (Reyes y Valery, 2007). Mientras que el maíz

coinoculado, con dosis al 50% del FN, tuvo un PFR de 28.78 g, estadísticamente diferente significativo comparado con el PFR del maíz sin inocular usado como CR con 17.66 g, lo que sugiere que tanto *Azotobacter* sp. y *Burkholderia* sp. transformaron los exudados radicales de esta gramínea en SPCV que indujeron una mayor formación de raíces secundarias que mejoro la absorción mineral (Escobar *et al.*, 20011).

Figura 6. Respuesta del maíz (*Zea mays* L) a la inoculación con *Azotobacter* sp. AIYLA1 y *Burkholderia* sp. BIYLA2 en su biomasa a nivel de floración.

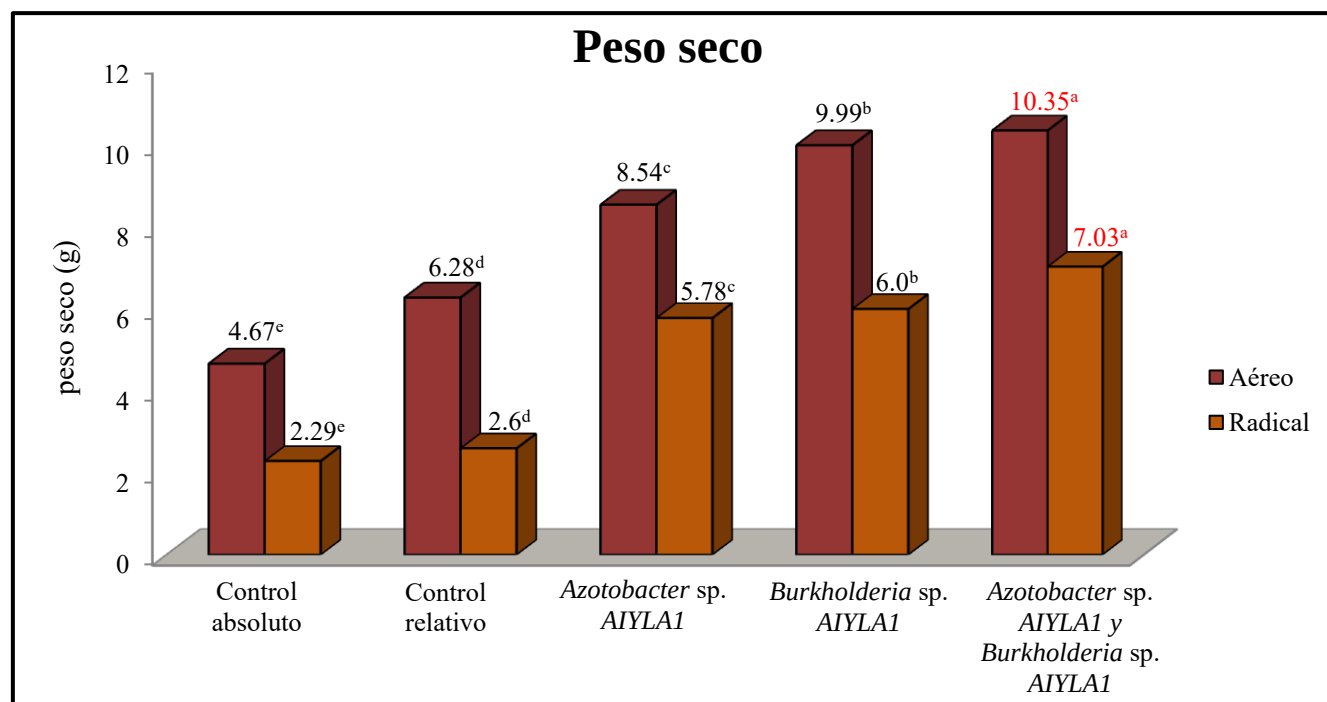


*Valores con diferentes letras con diferencia estadística ($P < 0.05$) según Tukey.

En la Figura 7, a nivel de floración, se muestra la respuesta del maíz a la inoculación mixta con *Azotobacter* sp. AIYLA1 y *Burkholderia* sp. BIYLA2 en su PSA que alcanzo 10.35 g, que fue alimentada con una dosis al 50% de FN, este valor de PSA fue estadísticamente significativo comparado con la misma gramínea no inoculada, que alcanzo un PSA de 6.28 g, en el caso de la coinoculación esta respuesta positiva del maíz se explica porque ambos géneros de BPCV, al colonizar su raíz convirtieron sus exudados radicales en SPCV, los que promovieron una mayor absorción de minerales, que son

transportados hacia la parte aérea al tallo y hojas del maíz (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2010). Mientras que cuando la gramínea se coinoculó con las dos BPCV, alimentada con el FN a dosis reducida al 50% tuvo un PSR de 7.03 g, estadísticamente significativo diferente comparado con su homólogo sin inocular usado como CR con 2.60 g de PSR, lo anterior sugiere que estas BPCV al colonizar la raíz, transformaron sus exudados radicales en SPCV, los que mejoraron su crecimiento y peso de raíces, por incremento en la concentración de materia seca en esa parte de la planta (García-Reyna *et al.*, 2005).

Figura 7. Respuesta del maíz (*Zea mays* L) a la inoculación con *Azotobacter* sp. *AIYLA1* y *Burkholderia* sp. *BIYLA2* en su biomasa a nivel de floración.



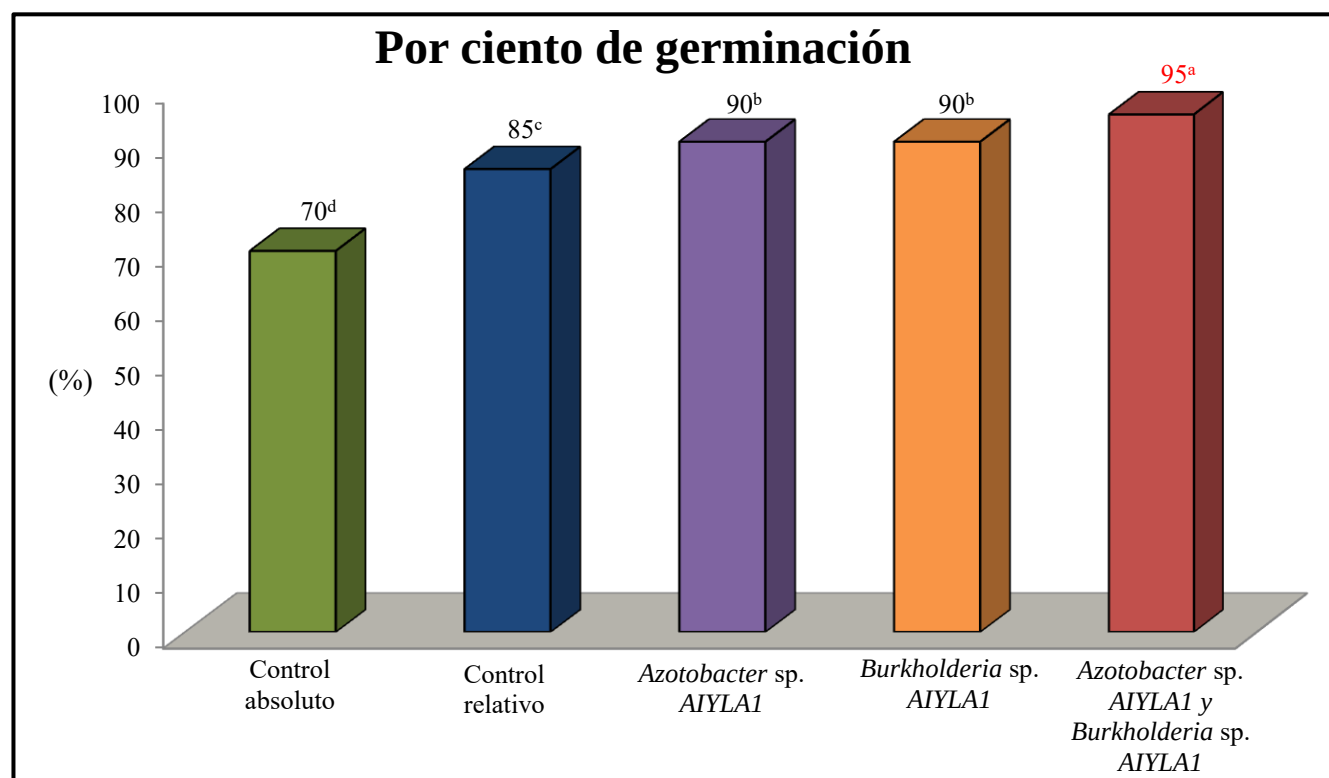
*Valores con diferentes letras con diferencia estadística ($P < 0.05$) según Tukey.

7.2. Evaluación de la inoculación del garbanzo (*Cicer arietinum* L) con *Azotobacter* sp.

AIYLA 1 y *Burkholderia* sp. *BIYLA2*

En la Figura 8, se muestra que la semilla de garbanzo coinoculada con *Azotobacter* sp. *AIYLA1* y *Burkholderia* sp. *BIYLA2*, alimentada con dosis al 50% de FN, dosis inferior a la recomendada para esta leguminosa, emergió en un 95%, estadísticamente superior comparada con la misma semilla de la leguminosa sin inocular y alimentada con la dosis 100% de FN, con 85% de porcentaje de germinación, lo que sugiere que las BPCV convirtieron los exudados de la esfermosfera de la leguminosa en SPCV, las que aceleraron su germinación (Escobar *et al.*, 2011).

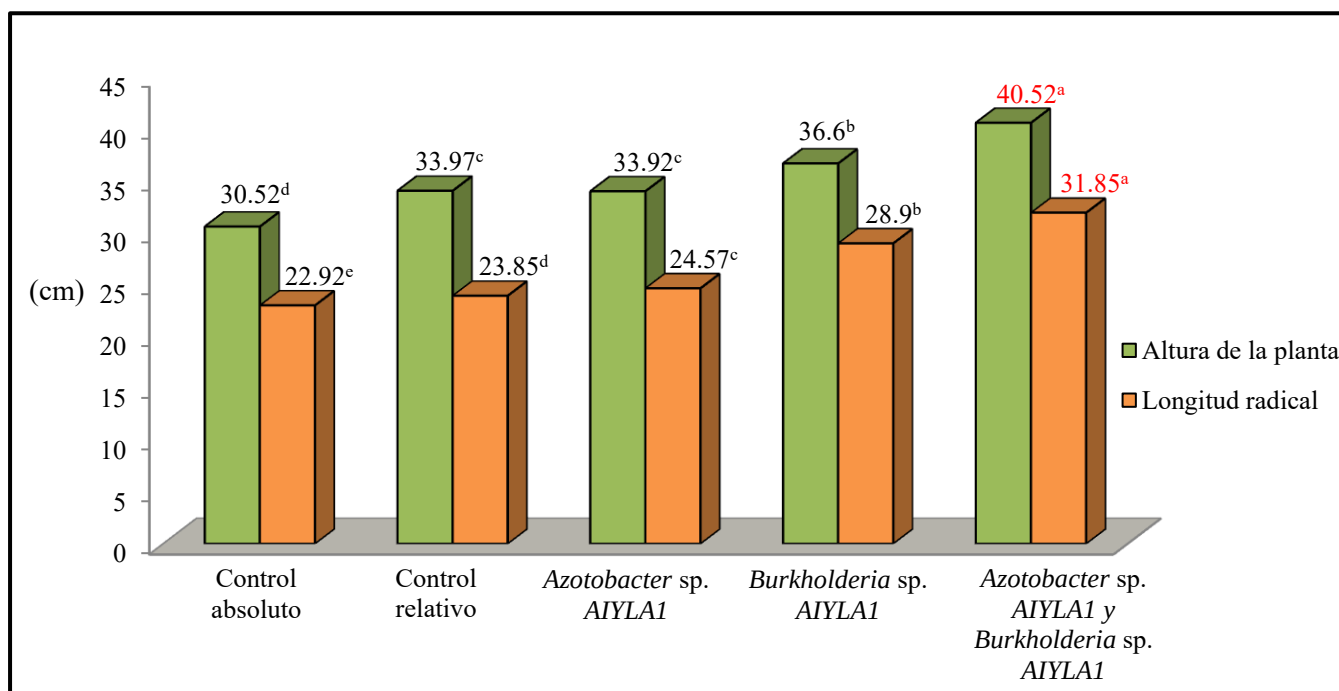
Figura 8. Respuesta de la semilla de garbanzo (*Cicer arietinum* L) a la inoculación con *Azotobacter* sp. *AIYLA1*, *Burkholderia* sp. *BIYLA2* y la mezcla de ambas sobre su germinación.



*Valores con letras distintas con diferencia estadística ($P < 0.05$) según Tukey.

En la Figura 9, se muestra la respuesta del garbanzo coinoculado con *Azotobacter* sp. *AIYLA1* y *Burkholderia* sp. *BIYLA2*, alimentado con FN a dosis de 50%, sobre su AP con 40.52 cm, lo que fue estadísticamente distinta y significativa comparada con su homóloga sin inocular usado como CR con 33.97 cm de AP, esta respuesta positiva del garbanzo a la inoculación mixta en su AP, sugiere que *Azotobacter* sp. en la rizósfera genero exudados radicales, que se transformaron en SPCV, mientras se supone que *Burkholderia* sp. indujo la absorción de minerales en el tallo, las hojas y yemas jóvenes y con ello su elongación (Rodelas *et al.*, 1999). Respecto al garbanzo coinoculado con las dos BPCV, a dosis 50% del FN, alcanzo 31.85 cm de LR; esta respuesta positiva del garbanzo fue estadísticamente significativa comparada con su homologo sin inocular usado como CR con 23.85 cm de LR; este resultado sugiere que *Azotobacter* sp. al colonizar la raíz, sintetizo SPCV y *Burkholderia* sp. endófito promovió la formación de pelos radicales secundarios (Prakash *et al.*, 2013).

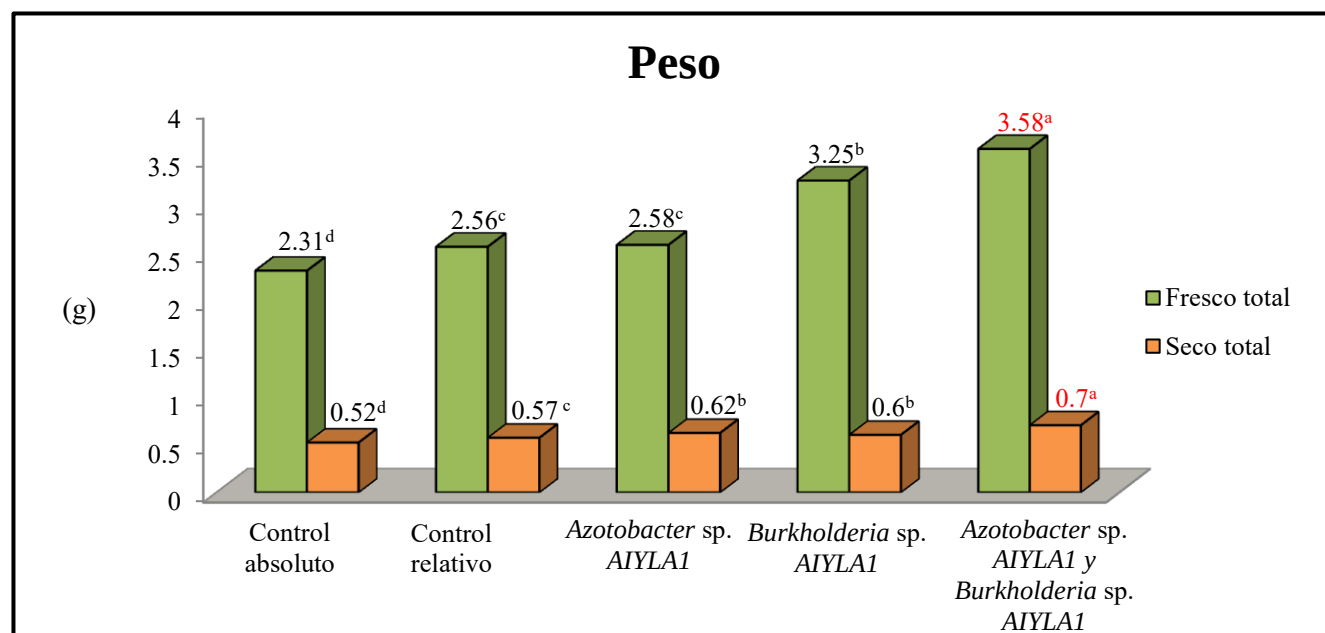
Figura 9. Respuesta del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) a la inoculación con *Azotobacter* sp. *AIYLA1* y *Burkholderia* sp. *BIYLA2* en su fenotípia a nivel de plántula.



*Valores con diferentes letras con diferencia estadística ($P < 0.05$) según Tukey.

En la Figura 10, a nivel de plántula, se muestra la respuesta del garbanzo a la doble inoculación con *Azotobacter* sp. AIYLA1 y *Burkholderia* sp. BIYLA2, con la dosis 50% del FN recomendado, registro 3.58 g de PFT, estadísticamente distinto significativo, comparado con la misma leguminosa sin inocular usada como CR con 2.56 g en su PFT, lo anterior sugiere que ambos géneros de BPCV, convirtieron los exudados radicales de la leguminosa en SPCV, que estimularon la producción de raíces laterales para una mayor absorción mineral (Prakash y Yadav, 2012). El garbanzo con inoculación mixta, con la dosis al 50% de FN, registro un PST de 0.70 g, estadísticamente diferente significativo comparado con su homologo sin inocular usado como CR con 0.57 g de PST, esto sugiere que *Azotobacter* sp. sensibilizo la raíz y *Burkholderia* sp. invadió los tejidos radicales donde sintetizo SPCV e indujo una mayor absorción de minerales en la raíz; por aumento de raíces secundarias; resultado similar se reporto en garbanzo coinoculado con *Pseudomonas jessenii* endofita y *Mesorhizobium* sp rizosferica, los que al asociarse promovieron el sano crecimiento y aumento en la absorción de minerales en la leguminosa (Valverde *et al.*, 2007).

Figura 10. Respuesta del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) a la inoculación con *Azotobacter* sp. AIYLA1 y *Burkholderia* sp. BIYLA2 en su biomasa a nivel de plántula.

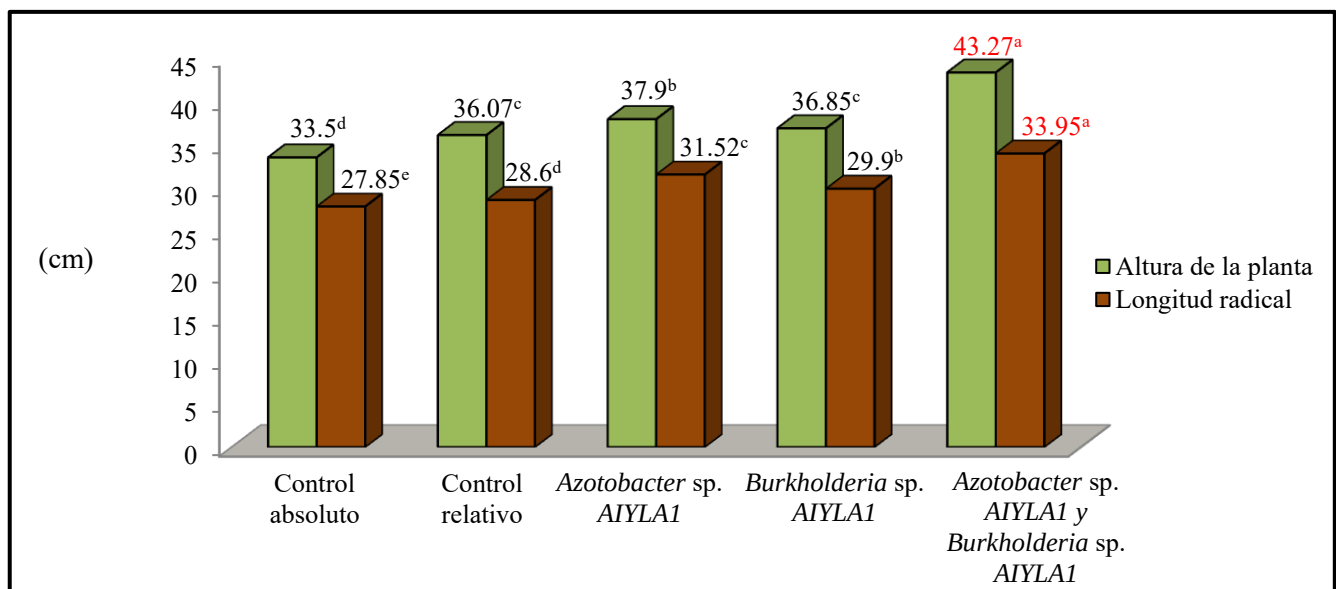


*Valores con diferentes letras con diferencia estadística ($P < 0.05$) según Tukey.

En la

Figura 11, se muestra la respuesta del garbanzo a la coinoculación con *Azotobacter* sp. *AIYLA1* y *Burkholderia* sp. *BIYLA2*, a dosis al 50% de FN, en su AP que alcanzo 43.27 cm, estadísticamente diferente significativa comparada con su homologo sin inocular usado como CR con 36.07 cm de AP; la respuesta positiva de la leguminosa a la inoculación mixta sugiere que los dos géneros de BPCV como: *Azotobacter* sp. que colonizo la raíz del garbanzo y *Burkholderia* sp. endófito pudieron transformar sus exudados radicales en SPCV y aceleraron el crecimiento de la planta; resultado similar se reporto en garbanzo coinoculado con *A. chroococcum* y *Rhizobium leguminosarum*, los que colonizaron la raíz y sintetizaron SPCV e indujeron el aumento del crecimiento de la leguminosa (Prakash y Yadav, 2012). El garbanzo coinoculado con ambos géneros de BPCV, con dosis al 50% de FN, alcanzo 33.95 cm de LR, estadísticamente distinta significativamente comparada con su homologo sin inocular usado como CR con 28.60 cm de LR, este resultado sugiere que la asociación entre ambas BPCV en la rizósfera del garbanzo, favoreció la síntesis de SPCV que indujeron la proliferación de pelos radicales secundarios y en consecuencia un aumento en la longitud radical y la absorción de minerales (Prakash *et al.*, 2010).

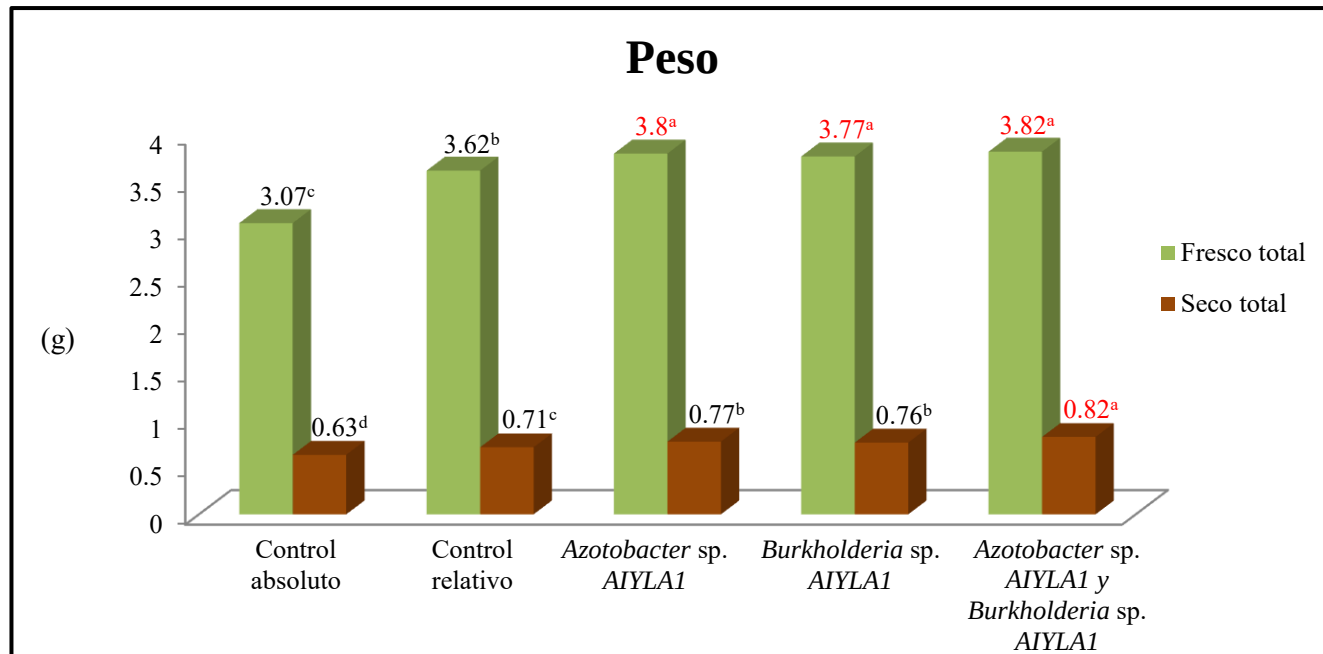
Figura 11. Respuesta del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) a la inoculación con *Azotobacter* sp *AIYLA1* y *Burkholderia* sp. *BIYLA2* y coinoculación con ambas, en su fenotípica a nivel de floración.



*Valores con diferentes letras con diferencia estadística ($P < 0.05$) según Tukey.

En la Figura 12, se analiza la respuesta del garbanzo con inoculación mixta de las BPCV, en su PFT que registro 3.82 g; el tratado con *Azotobacter* sp. *AIYLA1* alcanzo 3.80 g de PFT y el inoculado con *Burkholderia* sp. *BIYLA2* tuvo un PFT de 3.77 g, a la dosis 50% de N, la respuesta positiva del garbanzo fue estadísticamente diferente y significativa, comparada con la leguminosa sin inocular usada como CR alimentada con SM completa; lo que sugiere que tanto *Azotobacter* sp., como *Burkholderia* sp., convirtieron los exudados radicales del garbanzo en SPCV, las que indujeron una mayor absorción de minerales para el crecimiento de la leguminosa (Cutíño-Escalona, 2012). El análisis estadístico realizado a la respuesta del garbanzo con la doble inoculación de las BPCV, a dosis reducida de FN al 50%, registro un PST de 0.82 g, estadísticamente diferente significativo a la misma leguminosa sin inocular usada como CR con 0.71 g de PST, lo que sugiere que *Azotobacter* sp. y *Burkholderia* sp. transformaron aminoácidos de los exudados rizósfericos del garbanzo en SPCV y estimularon la proliferación de pelos radicales; con un aumento de biomasa radical, lo que mejoro su capacidad de absorción mineral (Rodelas *et al.*, 1999).

Figura 12. Respuesta del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) a la inoculación con *Azotobacter* sp. AIYLA1 y *Burkholderia* sp. BIYLA2 y coinoculación con ambas, en su biomasa a nivel de floración.



*Valores con diferentes letras con diferencia estadística ($P < 0.05$) según Tukey.

7.3. Aislamiento de *Azotobacter* sp A IYLA 1 y *Burkholderia* sp B IYLA 2 en *Leucena* sp

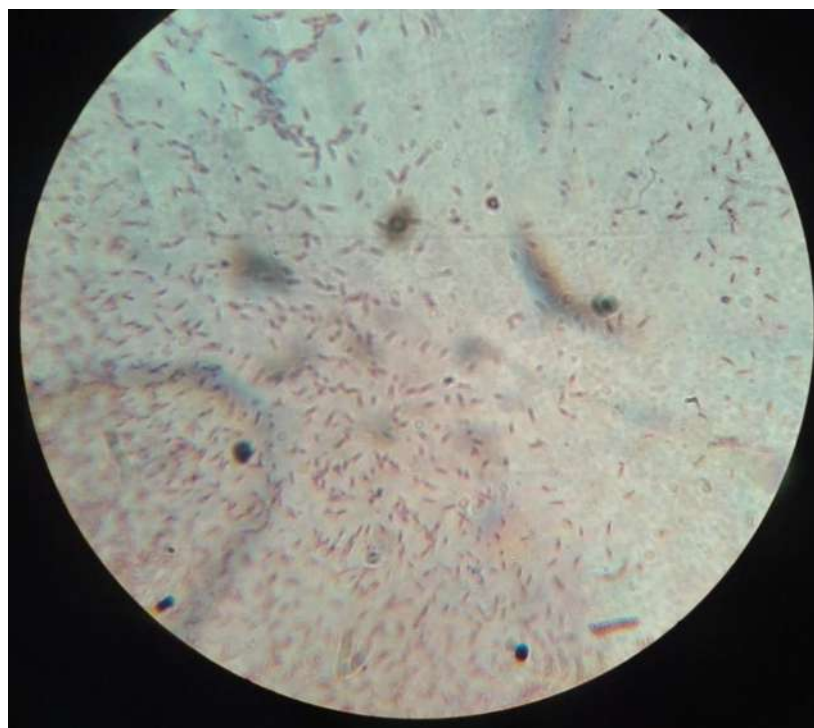
En la Figura 13, se muestra la morfología microscópica del aislado AIYLA1 recuperado de las raíces de *Leucaena* sp., con tinción Gram en el microscopio Carl Zeiss se observó un bacilo con 1.5-2.0 μm de diámetro, pleomórfico, en cadenas o pares, Gram Negativo. Según lo reportado en la literatura sugiere

que se

colonias

pardas

(Holt et



trata del género

Azotobacter sp., con

mucosas, opacas, café o

redondas en agar Burk

al., 2000).



Figura 13. Observación microscópica a 100X de *Azotobacter* sp. AIYLA1, bacilo Gram negativo, aislada de *Leucaena* sp.- crecida en agar Burk por 30 h/30°C.

En la Figura 14, se muestra la morfología microscópica de *Burkholderia* sp. BIYLA2 que se observó con el microscopio Carl Zeiss, con tinción Gram, es un bacilo corto o cocobacilo. La literatura señala que *Burkholderia* sp. es endófito, con colonias circulares convexas, enteras y brillantes en agar PCAT (Viallard *et al.*, 2000).



Figura 14. Observación microscópica a 100X de *Burkholderia* sp. *BIYLA2*, bacilo Gram negativo, aislada de *Leucaena* sp. crecida en PCAT por 30 h/30°C.

7.4. Formación de quistes en *Azotobacter* sp. *AIYLA1*

En la Figura 15, al realizar la tinción con yodo lugol, se observó la estructura de latencia redonda, de doble pared llamado quiste, en la literatura se reporta que *Azotobacter* sp., no produce endosporas, pero sí quistes, modificaciones estructurales y fisiológicas de sus células vegetativas con resistencia a: la desecación, desintegración mecánica, radiación ionizante, ultravioleta y predación, pero no con

resistencia al calor, no son completamente inactivos comparados con las endosporas bacterianas del género *Bacillus*, la producción de quistes es la principal propiedad que diferencia a *Azotobacter* sp, de otros géneros de BPCV fijadores de N₂, de vida libre o simbióticas (Holt *et al.*, 2000).

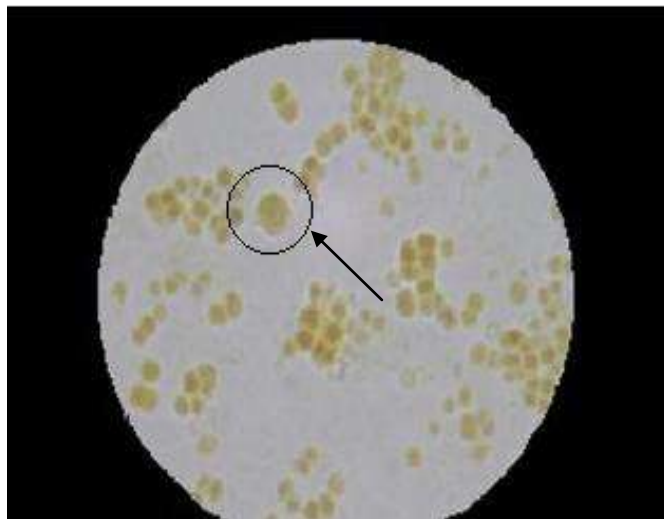


Figura 15. Observación microscópica a 100X de quistes en agar Burk en *Azotobacter* sp. *AIYLA1*, aislada de *Leucaena* sp en agar Burk con Butanol al 1% por 1 semana/30°C.

7.5. Resultados de las pruebas bioquímicas API20NE, para identificación de los géneros *Azotobacter* sp. *AIYLA1* y *Burkholderia* sp. *BIYLA2*

En el Cuadro 2, se muestra las principales pruebas bioquímicas de API20NE, con las que se identifico el género *Azotobacter* sp., la literatura al respecto señala la formación de quistes en n-butanol como fuente de Carbono (C) una propiedad básica de *Azotobacter* sp., distintiva de otros géneros fijadores de N₂ (Escobar *et al.*, 2011) esta capacidad no se ha detectado en ningún otro grupo bacteriano y es clave

en su separación de *Azospirillum* sp. Respecto a su perfil bioquímico, la literatura reporta: la utilización de manitol como fuente de energía y C, su capacidad para reducir el NO_3^- a NO_2^- , la fermentación de glucosa, la síntesis de ureasa y la asimilación de azúcares: maltosa, glucosa y caprato (Jiménez *et al.*, 2011). En la literatura se reporta que es un género heterótrofo, utiliza azúcares, alcoholes y sales de ácidos orgánicos para su crecimiento, son proteolíticas, utiliza NO_3^- , NH_4Cl y ciertos aminoácidos como fuentes de N, es catalasa positiva (Holt *et al.*, 2000). Se incluyeron pruebas bioquímicas complementarias de API 20NE, como hidrólisis de esculina, gelatinasa, β -galactosidasa, L-arabinosa, D-manosa, N-acetil-D-glucosamina, D-gluconato, adipato, L-malato, fenilacetato; según se reporta para confirmar su identificación como un miembro del género *Azotobacter* sp. (Winn *et al.*, 2008).

Cuadro 2. Comparación entre el comportamiento bioquímico de *Azotobacter* sp. AIYLA1 aislada de *Leucaena* sp. y *Azotobacter* spp. reportada en la literatura.

Pruebas bioquímicas	<i>Azotobacter</i> spp. (reportada en la literatura)	<i>Azotobacter</i> sp. A IYLA 1 (aislada de <i>Leucaena</i> sp)
Reducción de nitrato	+	+
Triptófano	-	-
Fermentación de glucosa	+	+
Arginina dehidrolasa	-	-
Ureasa	+	+
Hidrólisis de esculina	a**	+
Gelatinasa	a	+
β -galactosidasa	a	+
Pruebas de asimilación		
D-glucosa	+	+
L-arabinosa	a	+
D-manosa	a	+
D-manitol	+	+
N-acetil-D-glucosamina	a	+
Maltosa	+	+
D-gluconato	a	+
Caprato	+	+
Adipato	a	+
L-malato	a	+
Citrato	-	-
Fenilacetato	a	+
Producción de quiste	+	+

* Reacción (+)= positiva y Reacción (-)= negativa. **a= no considerada importante para este género.

En el Cuadro 3, se muestra las pruebas bioquímicas, con las que se identifico a la BPCV como el género: *Burkholderia* sp., su perfil bioquímico que la literatura reporta como básico: la capacidad de reducir el NO_3^- a NO_2^- , la oxidación del aminoácido triptófano para formar indol, una propiedad distintiva es que no fermenta glucosa, la hidrólisis de la L-arginina, además de la síntesis de ureasa y la asimilación de azúcares tales como: L-arabinosa, D-manosa, maltosa, L-malato, así como la utilización del citrato de sodio como única fuente de C (Viallard *et al.*, 2000). Se incluyeron otras pruebas bioquímicas de API 20NE, como hidrólisis de la esculina, de la gelatinasa, de la β -galactosidasa, del N-acetil-D-glucosamina, del D-gluconato, del caprato, del adipato, del fenilacetato, complementarias para definir con mayor precisión su pertenencia al género *Burkholderia* sp (Winn *et al.*, 2008).

Cuadro 3. Comparación entre el comportamiento bioquímico de *Burkholderia* sp. BIYLA2 aislada de *Leucaena* sp. y *Burkholderia* spp. reportada en la literatura.

Pruebas bioquímicas	<i>Burkholderia</i> spp (reportada en la literatura)	<i>Burkholderia</i> sp B IYLA 2 (aislada de <i>Leucaena</i> sp)
Reducción de nitrato	+	+
Triptófano	+	+
Fermentación de glucosa	-	-
Arginina dehidrolasa	+	+
Ureasa	+	+
Hidrólisis de esculina	a**	+
Gelatinasa	a	+
β -galactosidasa	a	+
Pruebas de asimilación		
D-glucosa	+	+
L-arabinosa	+	+
D-manosa	+	+
D-manitol	a	+
N-acetil-D-glucosamina	a	+
Maltosa	-	-
D-gluconato	a	+
Caprato	a	+

Adipato	a	+
L-malato	+	+
Citrato	+	+
Fenilacetato	a	+

* Reacción (+)= positiva y Reacción (-)= negativa. **a= no considerada importante para este género.

8. Conclusión

Leucaena sp., es una fuente de BPCV como *Azotobacter* sp. y *Burkholderia* sp. para plantas domesticas como: garbanzo y maíz; las que tuvieron una respuesta positiva a la coinoculación con los dos géneros bacterianos, alimentadas con una dosis de FN al 50%, inferior a lo recomendado para cada una, lo que sugiere una interacción sinérgica de tipo metabólica entre los dos géneros de BPCV, a favor del sano crecimiento de garbanzo y maíz.

9. Literatura citada

1. Aguirre-Medina, J.F., Irizar-Garza, M.B, Durán-Prado, A., Grajeda-Cabrera, O.A. 2009. Los biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México. Disponible en: http://www.redsicta.org/rhizobium_Pdf/BIOFERTILIZANTES%20MICROBIANOS.pdf.
2. Arellano, Y., García, E., Vázquez-Ramos, J. M. 2008. Auxin-stimulation of DNA synthesis and cell cycle proteins during maize germination. *Agrociencia* 42:637-644.
3. Armenta, A. D., García, C., Camacho, J. R., Apodaca, M. A., Montoya, L. G. Nava, E. 2010. Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Revista Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable* 6:51-56.
4. Camacaro, S, Garrido, J. C, Machado, W. 2004. Fijación de nitrógeno por *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium* y *Albizia lebbeck* y su transferencia a las gramíneas asociadas. *Zootecnia Tropical* 22:49-70.
5. Camelo, M., Vera, S. P., Bonilla, R. R. 2011. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 12:159-166.
6. Cutiño-Escalona, M. 2012. Inoculación de *Azotobacter chroococcum* en el cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum* L). *Revista Innovación Tecnológica* 18:1-7.
7. Díaz, A., Suárez, C., Yoelkis, M., Ciro, E., Orrantia, I., Castro, P. 2000. Efecto de la aplicación de *Azotobacter chroococcum* (BFN) sobre el desarrollo de posturas de cafeto (*Coffea arabica* L). *Revista Centro Agrícola* 26:41-44.
8. Escobar, C., Horna, Y., Carreño, C., Mendoza, G. 2011. Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp. y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate” en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria* 2:39-49.
9. García-González, M.M., Farías-Rodríguez, R., Peña-Cabriales, J. J., Sánchez-Yañez, J. M. 2005. Inoculación del trigo var. Pavón con *Azospirillum* spp. y *Azotobacter beijerinckii*. *Terra* 23:65-72.

10. Garcia, J.A., Castillo, A., Ramírez, M. E., Rendón, G., Larqué, M. U. 2001. Comparación de los procedimientos de Tukey, Duncan, Dunnett, HSU y Bechhofer para selección de medias. *Agrociencia* 35:79-86.
11. García-Reyna, M., Farías, R., Sánchez-Yáñez, J. M. 2005. *Burkholderia*, endófito del teocinte promotora crecimiento de maíz. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos33/burkholderia/burkholderia.shtml>
12. González-Leyva, M., González-Cruz, M., Nápoles-Gallardo, E., Baldaquín-Pagan, A. 2012. Efectividad de algunos biofertilizantes en el cultivo del garbanzo (*Cicer Arietinum*, L.) en un suelo Fersialítico Pardo Rojizo Mullido. *Innovación Tecnológica* 18:1-10.
13. Hernández, J. L., Cubillos-Hinojosa, J. G., Milian, P. E. 2012. Aislamiento de cepas de *Rhizobium* spp., asociados a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe. *Revista Colombiana de Microbiología Tropical* 2:51-62.
14. Hernández-Rodríguez, A., Heydrich-Pérez, M., Diallo, B., Jaziri, M. E., Vandeputte, O. M. 2010. Cell-free culture medium of *Burkholderia cepacia* improves seed germination and seedling growth in maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*). *Plant Growth Regulation* 60:191–197.
15. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T. 2000. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth edition. Lippincott Williams & Wilkins. pp. 105,108, 77.
16. Jiménez, D. J., Montaña, J. S., Martínez, M. M. 2011. Characterization of free nitrogen fixing bacteria of the genus *Azotobacter* in organic vegetable-grown Colombian soils. *Brazilian Journal of Microbiology* 42:846-858.
17. Luna, O. H. A., Sánchez-Yáñez, J.M. 1995. Interacción entre microorganismos y plantas. Manual de microbiología de suelo. 3º edición. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N. L. México. 3:95-98 (Inédito).
18. Martínez, E., Beltrán, E., López, J. 2011. La arquitectura radicular del maíz (*Zea mays* L). *Ciencia Nicolaita* 53:48-60.
19. Mora, E. y Toro, M. 2007. Estimulación del crecimiento vegetal por *Burkholderia cepacia*, una cepa nativa de suelos ácidos de sabanas venezolanas. *Revista Agronomía Tropical* 57: 123-128.
20. Piromy, P., Buranabanyat, B., Tantasawat, P., Tittabutr, P., Boonkerd, N., Teaumroong, N. 2011. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. *European Journal of Soil Biology* 47: 44-54.

21. Prakash, J. y Yadav, J. 2012. Evaluation of plant growth promoting rhizobacteria and their effect on plant growth and grain yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under sustainable agriculture. International Journal of Research in Engineering, computer and Social Sciences 2:51-57.
22. Prakash, J., Yadav, J., Nath, K., Kumar, A. 2013. Effect of indigenous *Mesorhizobium* spp and plant growth promoting rhizobacteria on yields and nutrients uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under sustainable agriculture. Ecological Engineering 51:282–286.
23. Ramírez, J., Sáinz, R. A., 1995. La solarización como herramienta para el control de malezas, patógenos y plagas del suelo. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos43/solarizacion-malezas/solarizacion-malezas3.shtml>
24. Reyes, I., Alvarez, L., Ayoubi, H. E., Valery, A. 2008. Seleccción y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. Bioagro 20:37-48.
25. Reyes, I. y Valery, A. 2007. Efecto de la fertilidad del suelo sobre la microbiota y la promoción del crecimiento del maíz (*Zea mays* L.) con *Azotobacter* spp. Bioagro 19:117-126.
26. Rodelas, B., González-López, J., Martínez-Toledo, M. V., Pozo, C., Salmerón, V. 1999. Influence of *Rhizobium*/*Azotobacter* and *Rhizobium*/*Azospirillum* combined inoculation on mineral composition of faba bean (*Vicia faba* L.). Biology Fertile Soils 29:165–169.
27. Salazar, E. Z., Nieves, B., Ruíz, J., Vila, J. 2008. Utilidad del Sistema API 20NE para identificar especies del género *Acinetobacter* y otros bacilos Gram negativos no fermentadores. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 28:89-95
28. Sánchez-Yáñez, J.M. 2007. Breve Tratado de Microbiología Agrícola Teoría y Práctica. COSUSTENTA, CIDEM, IIQB/UMSNH, ISBN 978-970-95424-1-7, Morelia, Mich. pp. 130-133, 136-138, 153-155.
29. Valverde, A., Burgos, A., Fiscella, T., Rivas, R., Velázquez, E., Rodríguez-Barrueco, C., Cervantes, E., Chamber, M., Igual, J.M. 2007. Differential effects of coinoculations with *Pseudomonas jessenii* PS06 (a phosphate-solubilizing bacterium) and *Mesorhizobium ciceri* C-2/2 strains on the growth and seed yield of chickpea under greenhouse and field conditions. Soil Biology Biochemical 1:43-50.
30. Viallard, V., Poirier, I., Cournoyer, B., Haurat, J., Wiebkin, S., Ophel-Keller, K., Balandreau, J. 2000. *Burkholderia graminis* sp. nov., a rhizospheric *Burkholderia* species, and reassessment of (*Pseudomonas*) *phenazinum*, (*Pseudomonas*) *pyrrocinia* and (*Pseudomonas*) *glathei* as *Burkholderia*. International Journal of Systematic Bacteriology 48:549-563.
31. Weirich, P. H., Lopes, A. R. C. 2012. Emergence of corn according to the sowing depth of the seed and loads on press wheels. Engenharia Agrícola 32:326-332.

32. Winn, W.C., Allen, S.D., Janda, W. M., Koneman, E. W., Procop, G. W., Schreckenberger, P. C., Woods, G. L. 2008. Diagnostico microbiológico texto y atlas en color. Editorial Médica Panamericana. 6°. Edición. Pag. 355.