

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y
ARTES DE CHIAPAS**

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE
Bacillus subtilis EN LA PROMOCIÓN
DEL CRECIMIENTO EN MAÍZ
(*Zea mays* L.)**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
**MAESTRA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

PRESENTA
ALONDRA ELIANETH GUTIÉRREZ CALVO

DIRECTOR:

Dra. Clara Luz Miceli Méndez
UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

CO-DIRECTOR:

Dr. Arsenio Gutiérrez Estrada
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE CHIAPAS

ASESOR

Dr. Miguel Ángel Peralta Meixueiro
UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Noviembre 2019



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas
19 de junio de 2019
Oficio No. DIP/0504/2019

C. Alondra Elianeth Gutiérrez Calvo
Candidato al Grado de Maestra Ciencias Biológicas
UNICACH
Presente

En virtud de que se me ha hecho llegar por escrito la **opinión favorable** de la Comisión Revisora que analizó su trabajo terminal denominado **"Evaluación del efecto de *Bacillus subtilis* en la promoción del crecimiento en maíz (*Zea mays* L.)"**, y que dicho trabajo cumple con los criterios metodológicos y de contenido, esta Dirección a mi cargo le **autoriza la impresión del documento** mencionado, para la defensa oral del mismo, en el examen que Usted sustentará para obtener el **Grado de Maestro en Ciencias Biológicas**.

Se le pide observar las características normativas que debe tener el documento impreso y entregar en esta Dirección un tanto empastado del mismo.

Atentamente

"Por la Cultura de mi Raza"



Dra. Magnolia Solís López
Directora



C.c.p. Expediente
*MSL/rags

Ciudad Universitaria. Lib. Norte Poniente núm. 1150
Colonia Lajas Maciel, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México
C.P. 29039 Tel: (01 961) 61 70 440 Ext. 4360
investigacionyposgrado@unicach.mx

De manera especial agradezco al Instituto de Ciencia, Tecnología e Innovación del Estado de Chiapas por el financiamiento de dicha tesis correspondiente al “Programa Jóvenes Divulgadores del Conocimiento beca de tesis Posgrado 2019”.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi papá, Prof. Amín Antonio Gutiérrez Márquez por el apoyo y amor que me dio pero sobre todo porque siempre creyó en mí.

AGRADECIMIENTOS

A los miembros de mi comité tutorial Dra. Clara Luz Miceli Méndez, Dr. Miguel Ángel Peralta Meixueiro, por su tiempo y apoyo brindado, por compartirme sus conocimientos y especialmente al Dr. Arsenio Gutiérrez Estrada por brindarme las facilidades para poder realizar este proyecto.

Al Biol. Mario Alberto López Miceli y a la Ing. Amb. Madahid Ortega Clemente por su valioso apoyo y colaboración durante el desarrollo de esta tesis.

A mi familia, a mi mamá, mi esposo, hermanos, cuñadas y sobrinos por su apoyo incondicional, tiempo, paciencia y porque juntos somos el mejor equipo.

Y a todas aquellas personas que de una u otra manera estuvieron involucradas en la culminación de esta tesis.

Gracias!

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. El maíz	5
2.2. La rizósfera y las rizobacterias.....	6
2.3. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	7
2.4. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal	9
2.4.1. Mecanismos directos de promoción de crecimiento vegetal.....	9
2.4.2. Métodos indirectos de promoción de crecimiento vegetal	13
2.5. <i>Bacillus spp.</i> promotor del crecimiento vegetal	14
2.6. Metabolitos secundarios producidos por <i>B. subtilis</i>	17
III. ANTECEDENTES	19
IV. HIPÓTESIS.....	22
V. OBJETIVOS:.....	22
5.1. General:	22
5.2. Específicos:.....	22
VI. MÉTODO	23

6.1. Preparación del inóculo.....	23
6.2. Desinfección de la semilla.....	24
6.3. Tratamientos	24
6.4. Siembra de las semillas en invernadero	25
6.4.1. Inoculación y siembra de las semillas.....	25
6.5. Transplante de plántulas.....	25
6.6. Parámetros a evaluar.....	26
6.7. Análisis de datos	27
VII. RESULTADOS.....	28
7.1. Efecto de la aplicación de dos cepas de <i>B. subtilis</i> sobre la Longitud de Raíz en plantas de maíz	28
7.2. Efecto de la aplicación de dos cepas de <i>B. subtilis</i> en el Peso de la Raíz en plantas de maíz.....	30
7.3. Efecto de la aplicación de dos cepas de <i>B. subtilis</i> sobre la Longitud de Tallo en plantas de maíz	31
7.4. Efecto de la aplicación de dos cepas de <i>B. subtilis</i> sobre el Diámetro del Tallo en plantas de maíz	32
7.5. Efecto de la aplicación de dos cepas de <i>B. subtilis</i> en el Peso del Tallo en plantas de maíz.....	33
7.6. Efecto de la aplicación de dos cepas de <i>B. subtilis</i> en el Peso Total en plantas de maíz.....	34

VIII. DISCUSIÓN	35
8.1. Organogénesis de raíz	35
8.2. Organogénesis de tallo	38
8.3. Peso total	40
IX. CONCLUSIONES	42
X.- RECOMENDACIONES.....	43
XI. LITERATURA CITADA.....	44
XII. ANEXOS	59
Anexo 1. Composición del medio de cultivo TSA (“Tryptic Soy Agar”, Merck®)	59
Anexos 2.- Resumen estadístico para Longitud de raíz.....	59
Anexo 3. Cuadro de sesgo estandarizado y/o la curtosis estandarizada	60
Anexo 4.- Prueba de Kruskal-Wallis para Longitud Raíz por tratamiento	60
Anexo 5.- Pruebas de rangos múltiple para Longitud Raíz por tratamiento	60
Anexo 6.- Resumen Estadístico para Peso Raíz	61
Anexo 7.- ANOVA para Peso Raíz por tratamiento con un nivel del 95.0% de confianza.....	61
Anexo 8- Pruebas de Rangos Múltiple para Peso Raíz por tratamiento	62
Anexo 9- Tratamientos estadísticamente significativos para la variable Peso de Raíz.....	62
Anexo 10- Resumen estadístico para Longitud de Tallo.....	63
Anexo 11-ANOVA para Longitud de Tallo por tratamiento.....	63

Anexo 12- Pruebas de Rangos Múltiple para Longitud de Tallo por tratamiento	64
Anexo 13- Tratamientos estadísticamente significativos para la variable Longitud de Tallo	64
Anexo 14- Resumen Estadístico para Diámetro de Tallo.....	65
Anexo 15- ANOVA para Diámetro de Tallo por tratamiento	65
Anexo 16- Pruebas de rangos múltiple para Diámetro de Tallo por tratamiento Método: 95.0 porcentaje LSD	66
Anexo 17- Tratamientos estadísticamente significativos para la variable Diámetro de Tallo.....	66
Anexo 18- Resumen Estadístico para Peso Tallo	67
Anexo 19- Tabla ANOVA para Peso Tallo por tratamiento con un nivel del 95.0% de confianza.....	67
Anexo 20- Pruebas de Rangos Múltiple para Peso Tallo por tratamiento.....	68
Anexo 21- Tratamientos estadísticamente significativos para la variable Peso de Tallo	68
Anexo 22- Resumen estadístico para Peso Total	69
Anexo 23.- ANOVA para Peso Total por tratamiento con un nivel del 95.0% de confianza.....	69
Anexo 24.- Prueba de Rangos múltiples para Peso Total por tratamiento.....	70
Anexo 25.- Tratamientos estadísticamente significativos para la variable Peso Total.....	70

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.- Mecanismos de acción directa de las rizobacterias promotoras del crecimiento	10
Cuadro 2.- Aislamiento de especies de género <i>Bacillus</i> de diferentes cultivos de interés económico.....	16
Cuadro 3.- Tratamientos.....	24
Cuadro 4.- Parámetros y método de medición del crecimiento en maíz.....	26
Cuadro 5.- Análisis estadístico del efecto de la aplicación de <i>B. subtilis</i> en maíz.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento.....	9
Figura 2.- Longitud de Raíz en plantas de maíz.....	28
Figura 3.- Peso de la Raíz en plantas de maíz.....	30
Figura 4.- Longitud de Tallo en plantas de maíz.....	31
Figura 5.- Diámetro del Tallo en plantas de maíz.....	32
Figura 6.- Peso del Tallo en plantas de maíz.....	33
Figura 7.- Peso Total en plantas de maíz.....	34

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como finalidad evaluar el efecto de dos cepas de *Bacillus subtilis* GBO3 y IN937b a dos concentraciones 10^7 UFC/ml y 10^8 UFC/ml en la promoción del crecimiento de maíz (*Zea mays* L.). Desarrollándose en dos fases, una de laboratorio y otra bajo condiciones de invernadero. Se empleó un experimento por bloques al azar con 5 tratamientos. De ellos, los tratamientos 1 y 2 con la cepa GBO3 a concentraciones de 10^7 UFC/ml y 10^8 UFC/ml respectivamente, los tratamientos 3 y 4 con la cepa IN937b a las mismas concentraciones y para el tratamiento 5 testigo o control se empleó agua. Los parámetros analizados fueron, altura de la planta, longitud de la raíz, peso de la raíz, peso fresco del tallo y diámetro del tallo. El experimento tuvo una duración de 40 días. Para el análisis estadístico se utilizó el software Statgraphics Centurion XV, aplicando ANOVA y prueba de la diferencia mínima significativa (LSD) $P=0.05$. La totalidad de los tratamientos experimentales presentaron un peso medio significativamente superior al testigo siendo los tratamientos GBO3 10^8 UFC/ml y IN937b 10^7 UFC/ml los de mejores resultados. La cepa que presentó la mayor promoción del crecimiento en el peso de la raíz fue GBO3 a una concentración de 10^8 UFC/ml. Respecto al crecimiento del tallo en cuanto a longitud, diámetro y peso, la mejor cepa fue IN937b a una concentración de 10^7 UFC/ml.

PALABRAS CLAVE

Rizobacterias, crecimiento, reguladores, endóspora y biofertilizante.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the effect of two strains of *Bacillus subtilis* GBO3 and IN937b at two concentrations of 10^7 CFU / ml and 10^8 CFU / ml on the growth promotion of maize (*Zea mays* L.). Developed in two phases, one laboratory and another under greenhouse conditions. A randomized block experiment with 5 treatments was used. Of these, treatments 1 and 2 with strain GBO3 at concentrations of 10^7 CFU / ml and 10^8 CFU / ml respectively, treatments 3 and 4 with strain IN937b at the same concentrations and for treatment 5 control or control was used water. The analyzed parameters were, plant height, root length, root weight, fresh stem weight and stem diameter. The experiment lasted 40 days. Statgraphics Centurion XV software was used for the statistical analysis, applying ANOVA and minimum significant difference test (LSD) $P = 0.05$. The totality of the experimental treatments showed an average weight significantly higher than the control, with the treatments GBO3 10^8 CFU / ml and IN937b 10^7 CFU / ml the best results. The strain that showed the greatest growth promotion in root weight was GBO3 at a concentration of 10^8 CFU / ml. Regarding the growth of the stem in terms of length, diameter and weight, the best strain was IN937b at a concentration of 10^7 CFU / ml.

KEYWORDS

Rhizobacteria, growth, regulators, endospore and biofertilizer.

I. INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es sensible a la acción de los fertilizantes: el tamaño del grano y su cantidad de proteínas están influidas por la presencia de nitrógeno y fósforo y el desarrollo de las raíces se favorece con fósforo y potasio; por lo que en su cultivo es común el uso de altas dosis de fertilizantes químicos como fuente de nutrientes. El uso de estos insumos agrícolas como estrategia unilateral de nutrición, es una práctica que eleva costos de producción e induce a diversos problemas como la acidificación de suelos, además de la contaminación de mantos freáticos debido a la lixiviación de nitratos y fosfatos (Graetz *et al.*, 1990). Además los fertilizantes químicos también provocan un efecto nocivo de mediano y largo plazo sobre otros elementos del sistema como los microorganismos que nutren el suelo y a la planta; que pueden tener consecuencias importantes sobre la salud humana (CICOPLAFEST, 2004).

En estas condiciones ocurre la degradación biológica; por ello, la implementación de prácticas amigables con el ambiente y que promuevan la restauración del equilibrio biológico de los suelos agrícolas son requeridas con urgencia para contribuir a una producción sostenible. Una alternativa es el uso de bacterias benéficas conocidas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Plant growth promoting rhizobacteria, PGPR) que pueden influir en la sanidad y estimular el crecimiento de las plantas (Kloepper y Schroth, 1980; Lynch y Whipps, 1991). Entre estas bacterias se encuentran diversas especies del género *Bacillus*,

junto con otros géneros como *Pseudomonas* (Tejera-Hernández *et al.* 2011, Santoyo *et al.*, 2012).

Las PGPR, pueden mejorar significativamente la germinación de las semillas, el desarrollo de las raíces, la utilización del agua por las plantas y absorción de nutrientes (Cattelan, 1999). Cuando las rizobacterias se inoculan artificialmente a la rizósfera de las plantas, estimulan y mejoran el crecimiento (Kloepper *et al.*, 1999; Gutiérrez-Mañero, 1996, Benchabane *et al.*, 2000).

La producción de sustancias reguladoras del crecimiento de plantas es uno de los modos de acción por el que las rizobacterias estimulan el crecimiento de plantas (Cattelan *et al.*, 1999), además del incremento de la absorción de nutrientes y disponibilidad de nitrógeno, el biocontrol, la resistencia sistémica inducida (Kloepper *et al.*, 1999; Van Peer *et al.*, 1991) y la producción de compuestos orgánicos volátiles (Ryu *et al.*, 2003).

II. MARCO TEÓRICO

2.1. El maíz

El maíz, *Zea mays* L. es considerado uno de los cereales más importantes y populares a nivel mundial gracias a sus múltiples beneficios y usos (FAO, 2011). Pertenece a la familia de las gramíneas, es originario del continente americano y aporta proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas A, B, y C, fibra y sales minerales como potasio, calcio y fósforo (Jiménez, 2012). Puede ser utilizado para consumo humano o animal y para la elaboración de productos industriales, como: harinas, espesantes, jarabes, endulzantes, licores, pegantes, medicamentos, entre otros (FAO, 2011; Polania Fierro, 2014).

La estructura de la planta está constituida por un tallo erecto principal alto, de consistencia interior filamentososa, carnosa y gran cantidad de agua. Las hojas están dispuestas en posición alterna al tallo y su estructura es lanceolada. La planta puede tener entre 15 y 30 hojas con longitud y ancho variable (Freeling *et al.*, 1994). El sistema radicular, se compone de una raíz primaria, la cual suministra el anclaje y los nutrientes a la planta, para posteriormente configurar un sistema de raíces adventicias fasciculadas, cuyo desarrollo dependerá de factores como la humedad y las condiciones del suelo (FAO, 2011).

2.2. La rizósfera y las rizobacterias

La rizósfera es la región de suelo que rodea y está influenciada por las raíces de las plantas. Es un complejo entorno donde las raíces interactúan con las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (Richardson *et al.*, 2009; Prashar *et al.*, 2013), esta subdividida en tres zonas, la primera, endorizósfera, que consiste en el tejido de la raíz, incluyendo la endodermis y las capas corticales; la segunda, el rizoplano, es la superficie de la raíz, donde las partículas del suelo y los microbios se adhieren y la ectorizósfera, consiste en el suelo inmediatamente adyacente a la raíz (Prashar *et al.*, 2013).

En la rizósfera, se presentan interacciones entre la planta, el suelo y la microfauna. Estas interacciones pueden tener influencias significativas en el crecimiento y desarrollo de las plantas y en el rendimiento de las cosechas. Las plantas pueden liberar compuestos orgánicos como, carbohidratos, aminoácidos, nucleótidos, flavonoides, enzimas, hormonas, lípidos y vitaminas a través de sus raíces los cuales crean un entorno dinámico estimulando el desarrollo de un gran número de microorganismos y la actividad de los mismos en el suelo (Lugtenberg *et al.*, 1999; Siddiqui *et al.*, 2006; Deneff *et al.*, 2009; Habibi *et al.*, 2014;).

Las bacterias que tienen la capacidad de colonizar las raíces de las plantas son denominadas rizobacterias, han tenido una evolución conjunta con las plantas, desarrollando interacciones que pueden generar efectos positivos, neutros o deléteros en el proceso de crecimiento vegetal y el efecto de su aplicación a la planta

puede diferir entre especies de plantas y prácticas de manejo de cultivos (Kloepper *et al.*, 1999; Habibi *et al.*, 2014).

Los efectos negativos o deletéreos que generan estos microorganismos pueden relacionarse con el retraso del crecimiento aéreo y radicular de las plantas debido a la secreción de fitotóxicas, fitohormonas o a la competencia de nutrientes con otros microorganismos nativos (Siddiqui *et al.*, 2006). Las neutras son aquellas cuya presencia en la planta no afecta ni positiva ni negativamente el desarrollo de la misma (Kloepper *et al.*, 1999; Vessey, 2003; Prashar *et al.*, 2013). Y aquellas que poseen efectos positivos en el desarrollo de la planta son conocidas como PGPR, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, las cuales permiten la productividad de los cultivos y el mejoramiento de la nutrición de la planta (Siddiqui *et al.*, 2006, Osorio, 2007).

2.3. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

Las Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, PGPR por sus siglas en inglés, fueron definidas por primera vez por Kloepper y Schroth (1978) para describir las bacterias del suelo que colonizan la rizósfera de las plantas, las cuales, mejoran las características biológicas y químicas de cultivos hortícolas y estimulan su crecimiento (Kloepper y Schroth, 1978; Perez-Montano *et al.*, 2014). Las PGPRs, incluyen un amplio grupo de géneros bacterianos, como, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Rhizobium* y *Erwinia* (Lucy *et al.*, 2004; Habibi *et al.*, 2014). De los cuales, *Pseudomonas* y

Bacillus son los microorganismos mayormente utilizados para la producción de inoculantes bacterianos a nivel comercial (Grobela *et al.*, 2015).

Las PGPR pueden estimular el crecimiento de las plantas mediante diferentes mecanismos como los son, la fijación de nitrógeno, la producción de sustancias como compuestos volátiles o fitohormonas (fitoestimulación), adquisición de nutrientes por parte de la planta (biofertilización) por medio de la solubilización de fosfatos, la secreción de sideróforos o la reducción del daño causado por enfermedades mediante la inhibición del crecimiento de patógenos a través de la producción de compuestos químicos diversos (Boddey y Dobereiner, 1988; Chabot *et al.*, 1996; Compant *et al.*, 2005; Mendes *et al.*, 2013). Se ha observado un incremento en la biomasa, desarrollo en sistemas radiculares y producción de cultivos de interés comercial como papa, tomate, trigo, maíz y soya (Bashan, 1998; Kumar *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2013; Prashar *et al.*, 2013). Respecto al mecanismo de control biológico existen reportes donde se confirma la capacidad de las PGPRs para reducir el desarrollo de enfermedades causadas por hongos, nemátodos y bacterias (Kloepper *et al.*, 1981; Hamdan *et al.*, 1991; Asaka y Shoda, 1996). La mayoría de estos están relacionados con patógenos del suelo, sin embargo, algunas PGPRs tienen la capacidad de inducir resistencia sistémica, reduciendo el impacto de ciertas enfermedades foliares (Bakker *et al.*, 2007).

2.4. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

Las rizobacterias pueden promover el crecimiento de las plantas por medio de diferentes mecanismos directos e indirectos (Kloepper *et al.*, 1981; Glick 2012) (Figura 1).

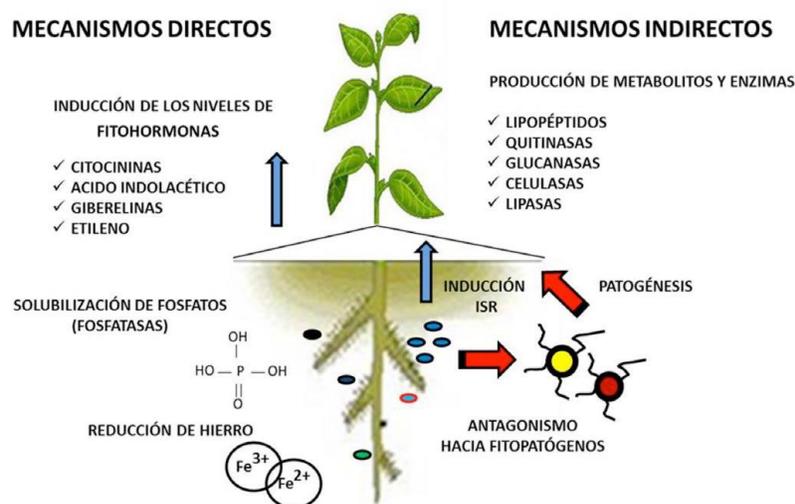


Figura 1. Mecanismos directos e indirectos de estimulación del crecimiento vegetal en rizobacterias del género *Bacillus*. Las bacterias pueden inducir la síntesis de hormonas en la planta, como citocininas, etileno, giberelinas, entre otras. Así mismo, a través de fosfatasa pueden solubilizar fosfato. La reducción de hierro puede ser también un mecanismo directo para mejorar la nutrición de la planta. Con respecto a los mecanismos indirectos, pueden inducir resistencia sistémica (ISR) en la planta o antagonizar a los patógenos por medio de la excreción de compuestos que degradan la pared celular, por ejemplo: quitinasas, celulasas y glucanasas. (Rojas-Solís *et al.* 2013).

2.4.1. Mecanismos directos de promoción de crecimiento vegetal

Los mecanismos directos de promoción de crecimiento son aquellos en los que las rizobacterias pueden influir positivamente en la planta, produciendo compuestos capaces de estimular el crecimiento vegetal o facilitan la absorción de nutrientes (Kloepper, 1992, Siddiqui *et al.*, 2006; Glick 2012; Prashar *et al.*, 2013), que pueden incluir diversos tipos de fitohormonas como las auxinas o citocininas, compuestos

orgánicos volátiles e incluso activando la producción in planta de compuestos que refuerzan la inmunidad vegetal como ácido jasmónico, ácido salicílico y fitoalexinas (Ahmad et al., 2008), esto ocurre independientemente del resto de la población microbiana del suelo (Cuadro 1).

Cuadro 1.- Mecanismos de acción directa de las PGPR (Sarabia *et al.*, 2010).

Mecanismo	Efecto
Fijación de nitrógeno asociada a la raíz	Biomasa y contenido en nitrógeno
Producción de hormonas (auxinas, citocininas , giberelinas)	Biomasa (parte aérea y radical); ramificación de raíces; floración
Inhibición de síntesis de etileno	Longitud radical
Aumento de la permeabilidad de raíz	Biomasa y captación de nutrientes

- **Fijación de nitrógeno**

La fijación biológica del nitrógeno atmosférico es un proceso mediante el cual algunas especies bacterianas, tanto simbióticas como no simbióticas, utilizan la enzima nitrogenasa para convertir el nitrógeno atmosférico (N₂) en amoníaco (Denton *et al.*, 2009; Glick 2012). Entre las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno se encuentran, *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, y *Sinorhizobium* (Bach Álvarez y Díaz, 2008; Calvo García, 2011). Entre las bacterias no simbióticas fijadoras de nitrógeno, se han reportado principalmente, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Bacillus* (Vessey, 2003; Reyes *et al.*, 2008; Hayat *et al.*, 2010).

Recientemente se ha planteado el uso de PGPRs como una alternativa viable para reducir el uso de fertilizantes nitrogenados a nivel agrícola, ya que estos microorganismos se encargan de promover el crecimiento de las plantas a través de la fijación biológica del nitrógeno (Pedraza, 2008).

- **Solubilización de fosfatos**

La solubilización del fósforo, se ha relacionado a la transformación de fosfatos orgánicos e inorgánicos a formas solubles por la planta. El fósforo es uno de los elementos químicos esenciales en los seres vivos; este compuesto forma parte de los ácidos nucleicos (ADN y ARN), del metabolismo energético (ATP) y da flexibilidad a las membranas celulares. Es uno de los 22 nutrientes más importantes para la planta, sin embargo, la concentración de fósforo disponible en el suelo generalmente es muy baja y sus formas asimilables como aniones dihidrógeno fosfato e hidrógeno fosfato es escasa (Freitas *et al.*, 1997; Jayakumar y Tan, 2005). Algunos microorganismos del suelo tienen la capacidad producir ácidos orgánicos o enzimas como fosfatasas, fitasas, fosfonatasas y liasas C-P para solubilizar porciones de fósforo insoluble (De Freitas *et al.*, 1997; Jayakumar y Tan, 2005). La producción y liberación a la rizósfera de estos ácidos, provocan la acidificación del suelo e incrementan directamente la solubilidad de los fosfatos. Las enzimas por su parte cumplen diferentes funciones, las fosfatasas participan en la desfosforilación de los grupos fosfoéster unidos a la materia orgánica, las fitasas, catalizan el proceso de hidrólisis del ácido fítico liberando de forma secuencial hasta seis grupos ortofosfatos libres y las fosfonatasas y C-P liasas, participan en la ruptura del enlace carbono-

fósforo de los organofosfonatos (Rodríguez *et al.*, 2006). Entre los microorganismos solubilizadores de fosfato se destacan los géneros, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Azospirillum* (Hayat *et al.*, 2010; Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2010).

- **Producción de reguladores de crecimiento vegetal**

La producción de reguladores de crecimiento vegetal, activan varias respuestas en la célula, entre ellas, el desarrollo y la regulación de muchos parámetros fisiológicos e incrementar la resistencia a diversos factores ambientales. Los reguladores del crecimiento se pueden dividir en cuatro grupos, auxinas, giberelinas, inhibición del etileno y citoquininas (Camelo *et al.*, 2011; Santos *et al.* 1996).

Varios géneros bacterianos han sido reportados como productores de reguladores de crecimiento, para la producción de auxina, se destacan *Azotobacter* sp., *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. (Ahmad *et al.*, 2008), y para la producción de giberelinas se han estudiado microorganismos como *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* y *Bacillus* sp (Bottini *et al.*, 2004).

La auxina más estudiada es el ácido indol acético (AIA) debido a su efecto en la promoción de crecimiento de las plantas mediante el aumento en la capacidad de anclaje a la tierra, la mejora en la captación de nutrientes y por ende en su capacidad de supervivencia (Patten y Glick, 2002). Las giberelinas pueden incrementar el crecimiento de los tallos, interrumpir el periodo de latencia de las semillas para germinar. La inhibición del etileno puede promover el crecimiento vegetativo y de las

raíces y puede tener un efecto en la reducción de síntomas por ataque de patógenos. Su inhibición puede ser estimulada por la presencia de altas concentraciones de auxinas, giberelinas o citoquininas (Camelo *et al.*, 2011).

2.4.2. Métodos indirectos de promoción de crecimiento vegetal

Los mecanismos indirectos de promoción de crecimiento son aquellos en los que las rizobacterias actúan como agentes de biocontrol para reducir enfermedades o para proteger las plantas de la degradación causada por suelos que han sido contaminados. Estos mecanismos son: la producción de sideróforos, la producción de compuestos antimicrobianos, y la resistencia sistémica inducida (Siddiqui *et al.*, 2006).

- **Producción de sideróforos**

La producción de sideróforos por rizobacterias puede considerarse un mecanismo de promoción de crecimiento tanto directo como indirecto. El hierro es un nutriente fundamental para el desarrollo y crecimiento de las plantas, pero, este no se encuentra de manera directa en la rizósfera, por lo tanto los microorganismos deben sintetizar o producir los sideróforos para hacer asimilable este micronutriente esencial (Siddiqui *et al.*, 2006). Los sideróforos son moléculas orgánicas de bajo peso molecular con alta capacidad para capturar el hierro en forma de Fe^{3+} como parte de sales e hidróxidos de baja solubilidad. Estas pequeñas moléculas, actúan de manera específica como agentes quelantes para secuestrar hierro en presencia de

otros metales y reducirlo a Fe^{2+} , una forma mucho más soluble y aprovechable para las plantas (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012).

- **Producción de antibióticos**

La producción de antibióticos es uno de los mecanismos más efectivos empleados por las PGPR para suprimir las enfermedades asociadas a los cultivos (Glick y Pasternak, 2003; Kinsella *et al.*, 2009). *Pseudomonas fluorescens* y las especies del género *Bacillus* juegan un papel muy importante como agente de biocontrol (Siddiqui, 2006). *B. subtilis* produce varias clases de antibióticos entre ellos: micobacilinas, iturinas, bacilomicinas, surfactinas, micosubtilinas, fungistatinas, subporinas fenazinas, pioluteorinas, pirrolnitrinas, tropolonas, piocianinas, kanosamina y zwittermina A.; los cuales, son eficaces supresores de patógenos en las plantas, como *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Laseptoriosis* y *Verticillium* (Kinsella *et al.*, 2009).

2.5. *Bacillus spp.* promotor del crecimiento vegetal

Los microorganismos del género *Bacillus spp.* representan una amplia variedad de bacterias del suelo, Gram positivas, aerobias estrictas o anaerobias facultativas y pertenecen al grupo de las bacterias formadoras de endosporas (Glick, 1995). Son un grupo de bacterias que tienen la capacidad de resistir a condiciones climáticas adversas como temperatura extrema, radiación UV, agentes oxidantes y corrosivos, sequías, fuertes lluvias y procesos de esterilización debido a su potencial de formación de esporas (Bai *et al.*, 2002; Vessey, 2003; Schulz *et al.*, 2006; Bashan *et*

al., 2010). Además, este género es considerado como una fábrica microbiana para la producción de una amplia gama de moléculas biológicamente activas y potencialmente inhibitorias para el crecimiento de fitopatógenos (Ongena y Jacques, 2008).

El ciclo de vida de estos microorganismos se divide en dos fases crecimiento vegetativo y esporulación donde se destacan dos morfologías celulares, las células vegetativas y las esporas. Durante el primer estado, la bacteria crece de forma exponencial cuando se encuentra en un medio donde las condiciones son favorables. Cuando los nutrientes comienzan a escasear, la bacteria esporula, formando una endóspora. Las células vegetativas colonizan el suelo hasta alcanzar altas densidades poblacionales y las esporas sobreviven a condiciones extremas gracias a sus formas latentes extremadamente resistentes (Errington, 2003, Tejera-Hernández *et al.* 2011). La formación de esporas en *B.subtilis* se da por una serie de mecanismos en los cuales la presencia de nutrientes como el nitrógeno, carbono y fosforo pueden inducir la esporulación, lográndose la producción de esporas en la fase estacionaria de crecimiento cuando los nutrientes se agotan (Sonenshein, 2000; Errington, 2003; Tejera-Hernández *et al.* 2011).

Los microorganismos de este género, son considerados algunos de los mejores candidatos para el desarrollo de productos biopesticidas y biofertilizantes eficientes desde un punto de vista tecnológico por su capacidad para producir esporas resistentes lo que hace que los productos tengan larga vida de anaquel y su

formulación y producción sea más fácil (Earl *et al.*, 2008; Hamdache *et al.*, 2011). La aplicación de cepas de PGPR en plantas ya sea en el sustrato o remojando las semillas se ha utilizado para mejorar el crecimiento y proteger a las plantas de diversas enfermedades (Kloepper *et al.*, 2004, Ryu *et al.*, 2007). Entre ellos, se destacan las cepas de *B. subtilis* como los más utilizados para la promoción de crecimiento y para controlar enfermedades cuando se aplica desde semillas hasta a plántulas (Kokalis-Burelle *et al.*, 2005; Cuadro 2).

Cuadro 2. Aislamientos de especies del género *Bacillus* de diferentes cultivos de interés económico y sus potencialidades para promover el crecimiento o el control biológico de hongos patógenos (Tejera-Hernández *et al.*, 2011).

ORIGEN	ZONA	ESPECIE	ACTIVIDAD DE INTERÉS AGRÍCOLA
Alfalfa	Rizósfera	<i>B. cereus</i>	Antagonismo contra <i>Phytophthora megasperma</i> .
Arroz	Rizósfera	<i>Bacillus pocheonensis</i>	Producción de ácido indolacético, solubilización de fosfatos.
		<i>Bacillus sp.</i>	. Antagonismo contra <i>Alternaria sp.</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Pyricularia oryzae</i> , producción de sideróforos.
		<i>Bacillus spp</i>	. Producción de ácido indolacético, solubilización de fosfatos.
Aguacate	Rizoplano	<i>B. subtilis</i>	Antagonismo contra <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , producción de enzimas hidrolíticas y lipopéptidos
Hierbas de pastos	Rizósfera	<i>Bacillus sp.</i>	Solubilización de fósforo.
Café	Rizósfera	<i>B. subtilis</i>	Antagonismo contra <i>Fusarium stilboides</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. xylarioides</i> , producción de lipasas, proteasas, β 1,3-glucanasa.
Soya	Rizósfera	<i>B. amyloliquefaciens</i> <i>B. cereus</i>	Antagonismo contra <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Sclerotinia minor</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. solani</i> y <i>Pythium ultimum</i> . Producción de quitinasas, celulasas, proteasas, auxinas.
Manzana	Rizósfera	<i>B. circulans</i>	Solubilización de fosfatos, producción de ácido indolacético, sideróforos, inhibición del crecimiento de hongos.

2.6. Metabolitos secundarios producidos por *B. subtilis*

B. subtilis es una especie bacteriana muy diversa, capaz de crecer dentro de muchos entornos (Earl *et al.*, 2008). Se destaca por su capacidad para producir una amplia gama compuestos estructuralmente diversos con fuertes propiedades antifúngicas, baja toxicidad y alta biodegradabilidad (Stein, 2005; Chen *et al.*, 2008). Entre estos compuestos, se encuentran los lipopéptidos cíclicos (LPs), los cuales han sido ampliamente estudiados por su actividad antagonista contra un gran rango de fitopatógenos bacterianos, fúngicos y oomicetos como *M. fijiensis*, *R. solanacearum*, *Botrytis cinerea*, *F. oxysporum* y *Pythium aphanidermatum* (Carrillo *et al.*, 2003; Leclere *et al.*, 2005; Ongena y Jacques, 2008).

Estos lipopéptidos cíclicos son de bajo peso molecular y anfifílicos, se clasifican en tres familias: surfactinas, iturinas y fengicinas. Cada familia, posee un heptapéptido cíclico de siete ácidos grasos en el caso de las iturinas y las surfactinas o 10 ácidos grasos en el caso de las fengicinas (Raaijmakers *et al.*, 2010). En cuanto a sus funciones las iturinas, se destacan por la eficacia contra una amplia variedad de patógenos importantes, como levaduras y algunos son potentes agentes fungicidas, sin embargo su actividad antibacteriana es baja. Las surfactinas por su parte, son conocidas por su gran actividad, antiviral y antibacteriana y su limitada actividad antifúngica, es un poderoso biosurfactante, y como tal disminuye la tensión superficial, actúa como un excelente detergente, emulsionante y ayuda a la formación de biopelículas. Las fengicinas, poseen una fuerte actividad antifúngica

principalmente contra de hongos filamentosos (Fahim *et al.*, 2012; Falardeau *et al.*, 2013).

Estos compuestos antimicrobianos proveen a la planta protección mediante diferentes mecanismos, directos e indirectos, tales como colonización de las raíces de las plantas, inducción de resistencia sistémica y antagonismo directo contra diversos microorganismos (Ongena y Jacques, 2008). Los mecanismos directos son aquellos en los que los lipopéptidos tienen contacto directo con la membrana celular de los fitopatógenos de la planta, provocando la formación de poros en la misma y como consecuencia un desbalance osmótico y los mecanismo indirectos son aquellos donde al detectar la presencia de un microorganismo patógeno se induce a la resistencia de la planta huésped (Pérez-García *et al.*, 2001; Falardeau *et al.*, 2013).

III. ANTECEDENTES

En los últimos años ha habido una creciente preocupación por la degradación de los suelos debido al uso de fertilizantes sintéticos, que los agricultores han empleado en sus cultivos de manera sistematizada desde hace varios años, lo cual ha implicado un mayor rendimiento de la tierra, pero también un desgaste importante a nivel químico, físico y biológico de esta. Esto ha resultado en que los científicos busquen maneras menos agresivas de hacer crecer las plantas y controlar las plagas, por lo que se han desarrollado otros sistemas llamados biofertilizantes. En países tropicales se ha observado con éxito la utilización de los sistemas de fertilización naturales y su aplicación en diferentes cultivos de interés como la caña de azúcar, trigo, arroz, tomate, algodón entre otros, con la reducción hasta del 50% de los fertilizantes nitrogenados y fosfóricos convencionales con un incremento en los rendimientos entre el 15-30% (Peñaranda *et al.*, 2005; Terry *et al.* 2005).

Bacillus subtilis no es potencialmente patógena, no produce endotoxinas y secreta proteínas al medio, algunas de ellas con propiedades antifúngicas, como la subtilinas y otros antibióticos de la familia iturinas. La subtilina secretada por *B. subtilis* actúa sobre la pared celular de los hongos (González y Fragoso, 2002). Se ha demostrado que induce resistencia sistemática natural de la planta contra el patógeno bacteriano y fungoso propiedad llamada Resistencia Sistemática Adquirida (SAR). También *B. subtilis* se ha utilizado industrialmente como bioinsecticida y biofungicida para el control biológico de *Phytophthora infestans*, *P. sojae* y *P. capsici* en suelos infestados por el patógeno en cultivos de frijol y tomate (Filippov y

Kuznetzova, 1994). Investigaciones recientes muestran que *B. subtilis*, no solamente inhibe al patógeno, sino que además, promueve el crecimiento de la raíz y la planta, e incrementa el contenido de lípidos, triglicéridos y esterol en las hojas del tomate (Nemec *et al.*, 1996). Del mismo modo se ha utilizado en el tratamiento de semillas de cereales, algodón y maíz.

Sánchez López *et al.* (2010), demostraron la capacidad intrínseca de las cepas TVL-1 y TVL-2 de *Enterobacter* sp., además las cepas *Pseudomonas* sp. PSO13, PSO14, y *Bacillus* sp. BEOO2 y BEOO3 para solubilizar una fuente de fósforo poco soluble. Donde la utilización de las cepas TVL-1, TVL-2 y PSO14 evidenciaron los mejores resultados. Las cepas TVL-1, TVL-2 y PSO13 presentaron actividad fosfatasa. Adicionalmente, las bacterias fueron capaces de producir indóles y sideróforos bajo las condiciones evaluadas. El experimento en invernadero evidenció que las cepas TVL-2 y PSO14 incrementaron de manera significativa la biomasa y desarrollo de la planta ($p \leq 0.05$) así como el rendimiento en la producción de frutos lo que se puede asociar a las capacidades bioquímicas.

También en el 2010, Ramirez y Kloepper demostraron que el suelo modula el rendimiento de las rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas de una manera específica, consistente con los mecanismos de acción involucrados. Para esto estudiaron las propiedades relacionadas con el fósforo (P) en el suelo y la concentración de inóculo en la promoción del crecimiento de plantas de col china por la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 productora de fitasa. Evaluaron dos

concentraciones de inóculo bajo cuatro regímenes de fósforo: sin adición de fósforo, fósforo inorgánico y dos niveles de fitato. Encontraron una interacción significativa entre el régimen de fósforo (P) y la inoculación bacteriana. FZB45 solo promovió el crecimiento de las plantas y la absorción de P a una tasa más alta de fitato, lo que confirma que la actividad de la fitasa es su mecanismo principal y que está limitada por la disponibilidad de fitato en el suelo. El efecto causado por la concentración de inóculo más baja fue superior al efecto por la mayor, lo que sugiere la participación simultánea de un efecto directo. Este efecto fue confirmado por una prueba sin suelo, que mostró una respuesta similar a la hormona. FZB45 produjo IAA in vitro, pero su papel no fue determinado.

Dadnia (2011) evaluó los efectos de 5 cepas de *B. subtilis* sobre plantas de maíz respecto a la aplicación de nitrógeno, de las cuales una presentó diferencias significativas respecto al control (fertilizantes nitrogenados), aumentando en un 32% el rendimiento total. Valery y Reyes (2013) demostraron que la inoculación individual y en consorcio de la cepa *B. subtilis* MF5 con una fertilización química de NK, incremento el peso seco del grano en 130 y 403%, el contenido de N en 463 y 116%, y el de P en 152 y 376%, respectivamente, lograban un aumento en la producción del grano de maíz y su calidad.

IV. HIPÓTESIS

El uso de las cepas GBO3 o IN937b de *Bacillus subtilis* promueven la organogénesis en plantas de maíz (*Zea mays* L.).

V. OBJETIVOS:

5.1. General:

- Evaluar los efectos de dos cepas de *Bacillus subtilis* a diferentes concentraciones en el crecimiento de maíz (*Zea mays* L.)

5.2. Específicos:

- Determinar la influencia de la cepa GBO3 de *B. subtilis* en la organogénesis de maíz (*Zea mays* L.).
- Determinar la influencia de la cepa IN937b de *B. subtilis* en la organogénesis de maíz (*Zea mays* L.).
- Comparar las respuestas organogénicas inducidas por las cepas GBO3 y IN937b de *B. subtilis* en maíz (*Zea mays* L.).
- Determinar la concentración óptima de *B. subtilis* para promover el crecimiento de maíz (*Zea mays* L.).

VI. MÉTODO

El presente trabajo se desarrolló en dos fases, la primera fue en un laboratorio de docencia de la Facultad de Ciencias Agronómicas campus V de la Universidad Autónoma de Chiapas donde se reactivaron las cepas de *B. subtilis*, la segunda fase comprendió la preparación del inoculante y la esterilización de las semillas para su inoculación, esto se realizó en el Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y posteriormente en el invernadero de la Secretaria del Campo (SECAMP) la siembra de las semillas; utilizándose semillas de maíz (*Zea mays* L.) de una variedad criolla llamada Campeón de la región Frailesca, Chiapas.

Se utilizaron las cepas GBO3 y IN937b de *Bacillus subtilis* que se obtuvieron del laboratorio de bacteriología del Dr. Joseph W. Kloepper, del Departamento de Fitopatología de Auburn University, Alabama, USA.

6.1. Preparación del inóculo

Para preparar el inóculo de *B. subtilis*, las cepas GBO3 y IN937b fueron sembradas en el medio de cultivo agar de soya tripticaseina (TSA - tryptic soy agar). Las células vegetativas se cosecharon 72 h después de la incubación a 28°C, se preparó la suspensión bacteriana en agua destilada estéril a dos concentraciones para cada cepa, 1×10^7 UFC ml y 1×10^8 UFC ml. (Posada, 2012; Park *et al.*, 2013). La determinación de la población bacteriana se realizó con la técnica del Número más Probable (NMP).

6.2. Desinfección de la semilla

Las semillas fueron seleccionadas en un tamaño similar, se colocaron en un recipiente y se trataron con una solución de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex®) al 6% durante 2 min, en agitación constante para favorecer el contacto del agente de esterilización. Se retiró el hipoclorito de sodio por decantación, posteriormente se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril con una duración de 1 min cada una (Reyes *et al.*, 2008; Canto-Martín *et al.*, 2004).

6.3. Tratamientos

El diseño experimental que se utilizó fue de bloques al azar. Se evaluaron 5 tratamientos (T), con 18 repeticiones por tratamiento, se utilizó una semilla por repetición, con un total de 72 unidades experimentales (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tratamientos para la determinación del efecto de la aplicación de dos cepas de *Bacillus subtilis* en plantas de maíz

TRATAMIENTOS	<i>Bacillus subtilis</i>	CONCENTRACIONES	UNIDADES EXPERIMENTALES
T1	GBO3	10^7 UFC/ ml	18
T2	GBO3	10^8 UFC /ml	18
T3	IN937b	10^7 UFC/ ml	18
T4	IN937b	10^8 UFC /ml	18
T5	Testigo	Agua	18
Total			72

Las soluciones bacterianas se aplicaron en tres ocasiones, primero se inoculó la semilla al momento de la siembra, la segunda a los 15 días siendo este el momento del trasplante de las plantas a macetas y la tercera a los 15 días posteriores al trasplante.

6.4. Siembra de las semillas en invernadero

6.4.1. Inoculación y siembra de las semillas

Las semillas fueron seleccionadas en un tamaño similar, se sumergieron en 500 ml de la solución bacteriana de acuerdo al tratamiento y en agua para el testigo, durante 20 min, después se sembraron a 3 cm de profundidad en charolas de germinación de 70 cavidades (tamaño de la cavidad 6 cm de diámetro por 15 cm de profundidad) con 1 semilla por cavidad; se utilizó un sustrato comercial estéril Peat moss (PREMIER ®) humedecido con agua. Por último se le agregó a cada semilla sembrada 5 ml de solución respectiva a su tratamiento. Las charolas se colocaron en el invernadero en estructuras que las mantuvieron separadas del suelo y se regaron todos los días manualmente hasta el día del trasplante (Canto-Matín *et al.*, 2004; García-Olivares *et al.*, 2007).

6.5. Trasplante de plántulas

A los 15 días de sembradas las semillas, las plántulas de maíz se trasplantaron a macetas de plástico de 20 cm de diámetro por 15 cm de profundidad, se utilizó un sustrato a base de 50% de Peat moss (PREMIER ®) y 50% de tierra negra, humedecido con agua (García-Olivares *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2012).

Al momento del trasplante las raíces de cada planta fueron sumergidas durante 1 min en solución bacteriana respectivo a su tratamiento; ya trasplantadas se les agregó junto al tallo 10 ml de solución. Las macetas se colocaron en las estructuras metálicas del invernadero y se regaron manualmente de forma

homogénea con 300 ml de agua, con un intervalo de 3 días. A los 15 días del trasplante se le aplicó en el tallo de cada planta 10 ml de solución bacteriana (García-Olivares *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2012).

6.6. Parámetros a evaluar

Para la toma de datos se eligieron plantas de maíz tratadas con las cepas GBO3, IN937b de *B. subtilis* y otras regadas con agua como testigo; a los 40 días de sembradas, se desprendieron de las macetas y se les retiró todo el sustrato del sistema radical, obteniéndose los datos a evaluar de 18 plantas por cada tratamiento. Los parámetros que se evaluaron se refieren en el cuadro 4 (Sánchez *et al.*, 2012; García; Lovaisa y Ulla, 2015).

Cuadro 4. Parámetros y método de medición del crecimiento en maíz (*Zea mays* L.).

	PARÁMETROS	MÉTODO
1.-	Longitud del Tallo/parte aérea (cm)	Se midió desde la base del tallo hasta el ápice de la hoja más nueva, con un vernier digital Traceable®
2.-	Longitud de Raíz (cm)	Se midió desde la base de las raíces hasta la punta de la raíz más larga, con un vernier digital Traceable®
3.-	Diámetro del Tallo(cm)	Se midió el diámetro basal del tallo con un vernier digital Traceable®
4.-	Peso fresco del tallo/parte aérea (g)	Se determinó pesando el tallo con sus hojas en una balanza analítica Ohaus®.
5.-	Peso fresco de la raíz (g)	Se determinó retirando los residuos de sustrato del sistema radical para después pesar todas las raíces en una balanza analítica Ohaus®.
6.-	Peso Total (g)	Se determinó pesando la parte aérea y el sistema radical de cada planta con una balanza analítica Ohaus®.

6.7. Análisis de datos

Los datos recabados de las variables evaluadas fueron analizados con el programa Statgraphics Centurion XV. Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza usando ANOVA con un nivel de confianza de 95% para identificar diferencias en los parámetros medidos; se realizó una prueba de rangos múltiples cuando se observaron diferencias significativas, método LSD para conocer entre que tratamientos se registraban dichas diferencias. Para el caso de los datos que no cumplieron con los supuestos de normalidad se realizó un análisis no paramétrico por medio del test de Kruskal Wallis con un nivel de confianza de 95%.

VII. RESULTADOS

7.1. Efecto de la aplicación de dos cepas de *B. subtilis* sobre la Longitud de Raíz en plantas de maíz

De acuerdo a la asimetría y/o curtosis estandarizada (Anexo 3) indica que no hay normalidad en los datos por lo que se procedió a realizar un análisis de Kruskal-Wallis (Anexo 4) donde las diferencias observadas para los datos de Longitud de raíz entre los 5 tratamientos no son estadísticamente significativas $p= 0.166$; (Figura 2).

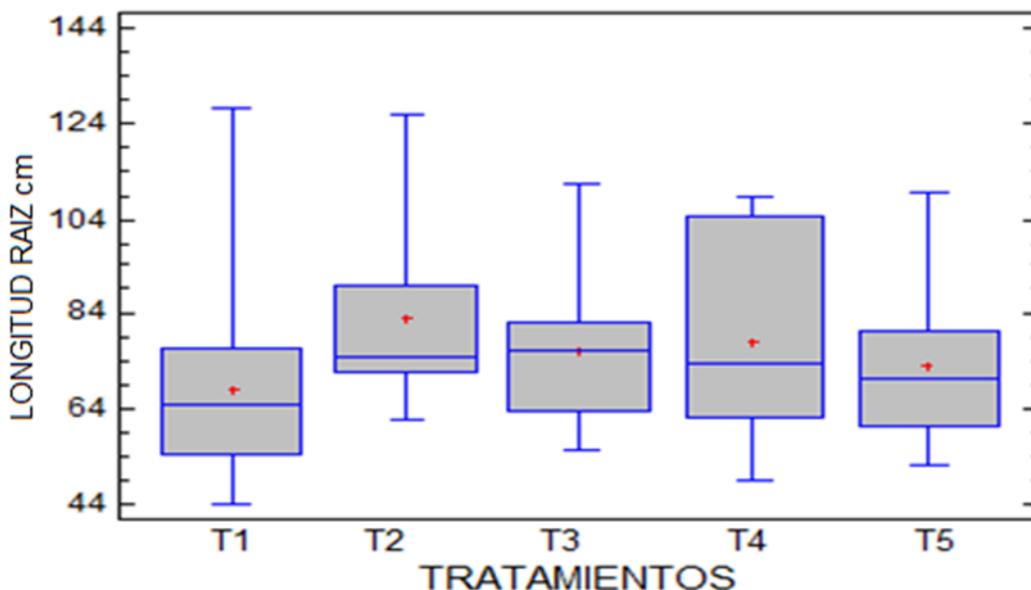


Figura 2. Longitud de la raíz de las plantas de maíz inoculadas con dos cepas de *B. subtilis* a dos concentraciones (10^7 UFC/ ml y 10^8 UFC/ ml) y plantas testigo.

Cuadro 5. Efecto de la aplicación de las cepas GBO3 y IN937b de *B. subtilis* a diferentes concentraciones sobre el crecimiento de maíz (Anexo 2, 5, 6, 8-10, 12-14, 16-18, 20-22, 24, 25).

NO.	TRATAMIENTO	LONGITUD DE RAÍZ			PESO RAÍZ			LONGITUD DE TALLO			DIÁMETRO DE TALLO			PESO DE TALLO			PESO TOTAL		
		P	CC	±SD	P	CC	±SD	P	CC	±SD	P	CC	±SD	P	CC	±SD	P	CC	±SD
T1	GBO3 10 ⁷ UFC/ ml	67.92	-7.00%	20.84 a	6.03 *	70.34%	2.36 bc	18.60	-6.86%	1.98 ab	0.51	2.00%	0.08 a	3.81 *	25.33%	1.13 b	9.84 *	49.54%	3.23 b
T2	GBO3 10 ⁸ UFC/ ml	82.75	13.31%	17.77 c	7.30 *	106.21%	2.02 c	21.60	8.16%	3.86 cd	0.54	8.00%	0.07 ab	3.99 *	31.25%	0.84 bc	11.29 *	71.58%	2.34 b
T3	IN937b 10 ⁷ UFC/ ml	75.96	4.01%	13.67 bc	6.67 *	88.42%	1.39 bc	23.67 *	18.53%	3.15 d	0.60 *	20.00%	0.06 b	4.62 *	51.97%	0.65 c	11.29 *	71.58%	1.57 b
T4	IN937b 10 ⁸ UFC/ ml	78.17	7.04%	21.08 bc	5.95 *	68.08%	1.37 b	16.51 *	-17.33%	3.44 a	0.51	2.00%	0.09 a	3.95 *	29.93%	0.97 b	9.91 *	50.61%	2.05 b
T5	TESTIGO	73.03	0%	18.32 bc	3.54	0%	1.41 a	19.97	0%	4.18 bc	0.50	0%	0.05 a	3.04	0%	0.67 a	6.58	0%	1.79 a

Cuadro de análisis estadístico

P= Promedio

CC = Coeficiente de crecimiento respecto a testigo. Expresa el porcentaje de crecimiento de los tratamientos en relación con el testigo.

(± SD) = Desviación Estándar

* = Diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo con un nivel del 95.0% de confianza ($p < 0.05$)

7.2. Efecto de la aplicación de dos cepas de *B. subtilis* en el Peso de la Raíz en plantas de maíz

De acuerdo con el análisis de varianza (Anexo 6) del peso de la raíz las diferencias observadas entre los tratamientos son estadísticamente significativas $p=0.0000$ (Anexo 7). Los tratamientos que presentan diferencias estadísticamente significativas son T2 con T4, T5 y T5 con T1, T2, T3, T4 (Cuadro 5); donde el tratamiento que presenta una mejor respuesta es el número 2 (GBO3 10^8 UFC/ml) (Figura 3), con un promedio de 7.30 g (Cuadro 5).

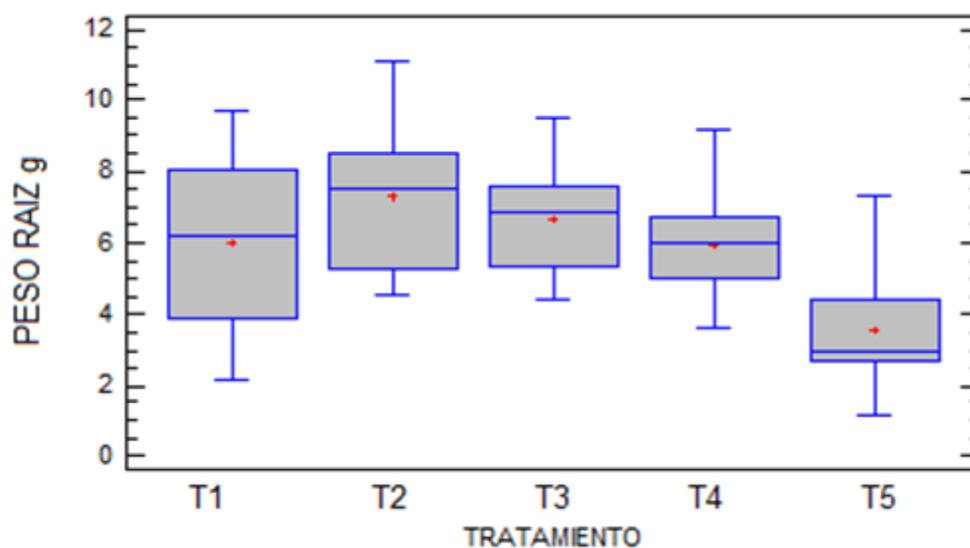


Figura 3. Peso de raíz en plantas de maíz inoculadas con dos cepas de *B. subtilis* a dos concentraciones (10^7 UFC/ ml y 10^8 UFC/ ml) y plantas testigo.

7.3. Efecto de la aplicación de dos cepas de *B. subtilis* sobre la Longitud de Tallo en plantas de maíz

De acuerdo con el análisis de varianza (Anexo 10) de Longitud de Tallo las diferencias observadas entre los tratamientos son estadísticamente significativas $p=0.0000$ (Anexo 11). Los tratamientos que presentan diferencias estadísticamente significativas son T1 con T2 y T3; T2 con T1 y T4; T3 con T1, T4, T5, y T4 con T2, T3 y T5 (Anexo 13) donde los tratamientos que presentaron una mejor respuesta fueron el número 3 (IN937b 10^7 UFC/ ml) con una longitud promedio de 23.67 cm y el número 4 (IN937b 10^8 UFC/ ml) con una longitud promedio de 16.51cm (Cuadro 5 y Figura 4).

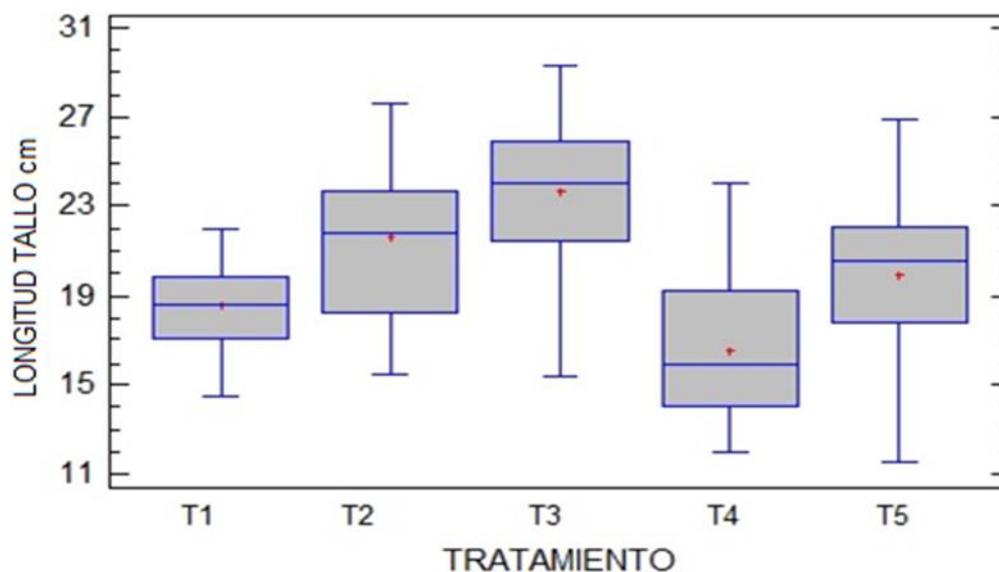


Figura 4. Longitud de Tallo de las plantas de maíz inoculadas con dos cepas de *B. subtilis* a dos concentraciones (10^7 UFC/ ml y 10^8 UFC/ ml) y plantas testigo.

7.4. Efecto de la aplicación de dos cepas de *B. subtilis* sobre el Diámetro del Tallo en plantas de maíz

De acuerdo con el análisis de varianza (Anexo 14) para el diámetro del tallo las diferencias observadas entre los tratamientos son estadísticamente significativas $p=0.0011$ (Anexo 15). Los tratamientos que presentan diferencias estadísticamente significativas son T1 con T3 y T3 con T1, T4, T5, (Anexo 17); donde el tratamiento que presenta la mejor respuesta es el número 3 (IN937b 10^7 UFC/ ml) con un diámetro promedio de 0.60 cm (Cuadro 5 y Figura 5).

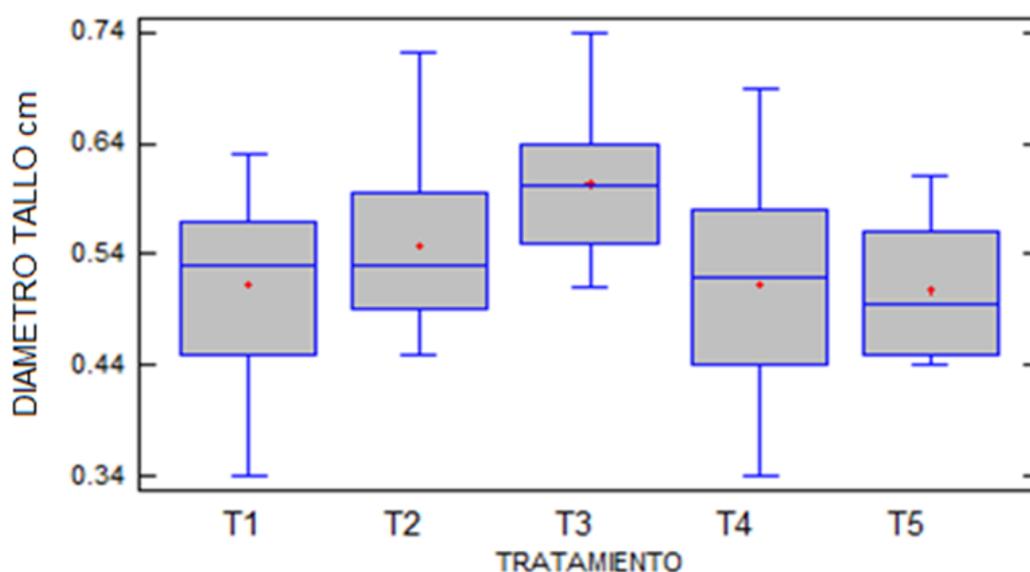


Figura 5. Diámetro del Tallo de plantas de maíz inoculadas con dos cepas de *B. subtilis* a dos concentraciones (10^7 UFC/ ml y 10^8 UFC/ ml) y plantas testigo.

7.5. Efecto de la aplicación de dos cepas de *B. subtilis* en el Peso del Tallo en plantas de maíz

De acuerdo con el análisis de varianza (Anexo 18) realizado para el peso del tallo las diferencias observadas entre los tratamientos son estadísticamente significativas $p=0.0000$ (Anexo 19). Los tratamientos que presentan diferencias estadísticamente significativas son T1 con T3, T5; T3 con T1, T4, T5 y T5 con T1, T2, T3, T4, (Anexo 21); donde se observa que el tratamiento número 3 (IN937b 10^7 UFC/ml) es el que presentó mejor respuesta con un peso promedio de 4.62 g (Cuadro 5 y Figura 6).

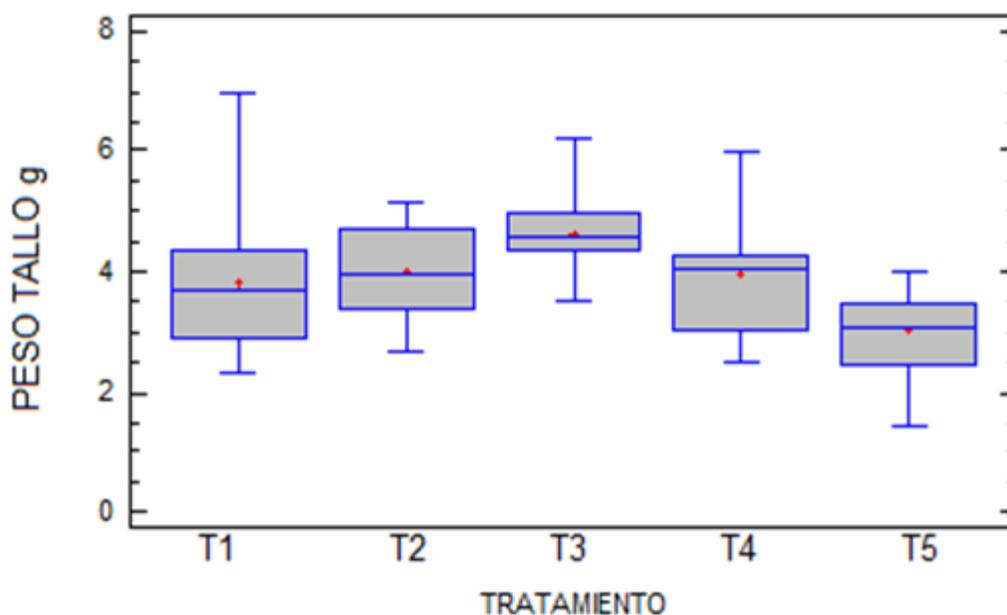


Figura 6. Peso del tallo de plantas de maíz inoculadas con dos cepas de *B. subtilis* a dos concentraciones (10^7 UFC/ ml y 10^8 UFC/ ml) y plantas testigo.

7.6. Efecto de la aplicación de dos cepas de *B. subtilis* en el Peso Total en plantas de maíz

De acuerdo con el análisis de varianza (Anexo 22) para el Peso Total, las diferencias observadas entre los tratamientos son estadísticamente significativas $p=0.0000$ (Anexo 23). Los tratamientos que presentan diferencias estadísticamente significativas son T5 con T1, T2, T3, T4 (Anexo 25); donde el tratamiento número 3 (IN937b 10^7 UFC/ml) es el que presenta la mejor respuesta con un promedio de 11.29 g (Cuadro 5 y Figura 7).

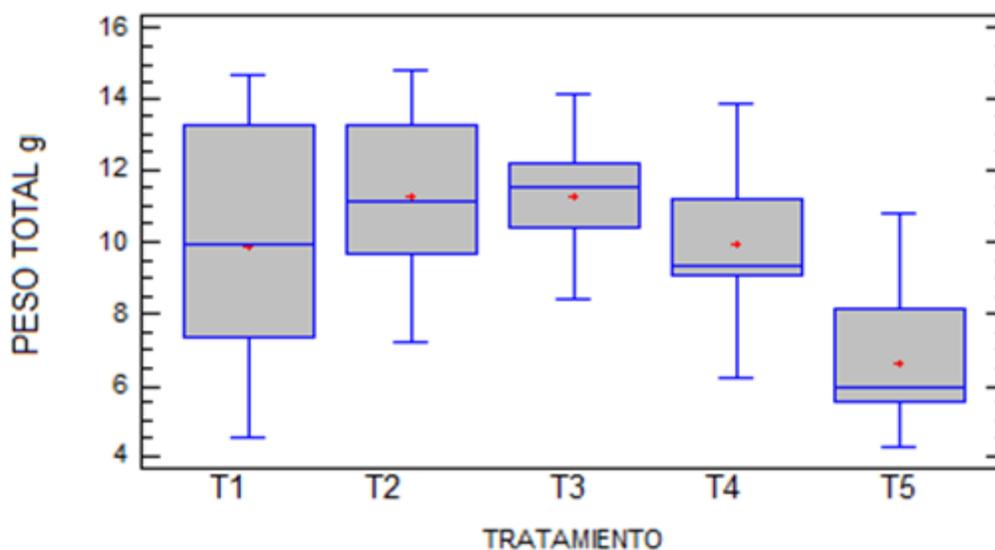


Figura 7. Peso total de plantas de maíz inoculadas con dos cepas de *B. subtilis* a dos concentraciones (10^7 UFC/ ml y 10^8 UFC/ ml) y plantas testigo.

VIII. DISCUSIÓN

8.1. Organogénesis de raíz

La rizósfera es la región del suelo influenciada por las raíces de las plantas y es el sitio donde ésta interactúa con las propiedades físicas, químicas y biológicas del mismo, generando interacciones que pueden tener influencias importantes en su desarrollo (Richardson *et al.*, 2009), una de las interacciones más significativas que se llevan a cabo en la rizósfera es la interacción con microorganismos, dentro de los que destacan las rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR), cuya función es estimular el crecimiento de las plantas por medio de la síntesis de fitohormonas y el incremento de la disponibilidad de nitrógeno y minerales (Xie *et al.* 2009).

A nivel comercial las cepas de *B. subtilis* se encuentran reportadas entre las más utilizadas para la promoción del crecimiento y el control de enfermedades cuando se aplican desde semillas hasta plántulas (Kloepper *et al.*, 2004; Kokalis-Burelle *et al.*, 2005; Ryu *et al.*, 2007). De acuerdo con Wang *et al.* (2018) estas cepas pueden promover el crecimiento, regulándolo por medio de la producción de fitohormonas (auxinas, citocininas, giberelinas y etileno) y enzimas (ej. 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa) además de promover la mineralización de nutrientes (v .g., solubilización de fosfato, potasio y zinc), fijación de nitrógeno e incremento de la capacidad de absorción de las raíces, siendo particularmente prometedoras las cantidades de fitohormonas y sideróforos producidos por *B. subtilis* respecto a cepas de otras especies.

En el presente estudio se observó que las cepas *B. subtilis* GBO3 y IN937b, presentan efectos sobre el crecimiento de las raíces, este crecimiento se vio reflejado en la obtención de raíces con un peso significativamente mayor (Anexo 2) obteniéndose medias de 7.3 y 6.67 g para los tratamientos 2 y 3 respectivamente (cepas GBO3 10^8 UFC/ml y IN937b 10^7 UFC/ml), esto significa un incremento del 106 y 88% con respecto a los 3.54 g del testigo (Cuadro 5), en lo que respecta a la longitud de las raíces no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Anexo 4; Kruscal-Wallis).

De acuerdo con Xie *et al.* (2009) la cepa *B. subtilis* GBO3 induce efectos benéficos en el crecimiento de *Arabidopsis* mediante la emisión de compuestos volátiles, que inducen la promoción del crecimiento a largo plazo, fotosíntesis elevada y la acumulación de hierro. Estos compuestos estimulan los sistemas de regulación de múltiples hormonas, entre ellas, auxinas y el ácido abscísico, dicha regulación se da mediante la inducción de la expresión de genes relacionados a la producción de estos reguladores.

Si bien Xie *et al.* (2009) no identifican los compuestos volátiles, autores como Raghavendra y McSpadden (2005) y Choudhary *et al.* (2011) refieren que las cepas GBO3 y IN937a producen compuestos orgánicos volátiles como 2,3-butanediol y 3-hydroxy-2-butanone (acetoin), que probablemente estén relacionados con los efectos descritos por Xie *et al.* (2009), es importante mencionar que las cepas IN937a e IN937b presentan genes en común como el *bmyB* únicamente detectados para esas

dos cepas entre las 168 analizadas (Raghavendra y McSpadden, 2005), por lo que probablemente la cepa IN937b presente producción de dicho tipo de compuestos volátiles.

Tomando en cuenta lo anterior, el incremento en el peso de las raíces de las plantas de maíz empleadas en el estudio, está probablemente relacionado con la estimulación de los genes responsables de la producción auxinas en maíz, debido a que, no se obtuvieron raíces con longitudes significativamente mayores, las raíces obtenidas presentaron una mayor robustez e incremento de peso (Cuadro 5).

En lo que respecta a la cepa IN937b los resultados demuestran un peso promedio de raíces semejante a los de la cepa GBO3 (Cuadro 5), lo anterior se debe a que ambas cepas pertenecen a la misma especie y probablemente la cepa IN937b produzca compuestos semejantes, mismos que deberán ser revisados en estudios posteriores.

Es importante mencionar que en todos los tratamientos fue posible obtener pesos de raíz significativamente mayores al testigo (Cuadro 5) independientemente de la dosis de aplicación de las cepas estudiadas, por lo que ambas cepas poseen actividad promotora al menos en las dosis probadas; la mejor cepa y dosis para la promoción del crecimiento de raíces fue GBO3 a 10^8 UFC/ml.

8.2. Organogénesis de tallo

El tallo de las plantas cumple dos funciones importantes, dar sostén a la planta y transportar el agua y los nutrientes, por ello, la obtención de tallos robustos permite mejorar la productividad general del organismo y su resistencia a eventos físicos como lo es la acción del viento. En algunos casos los tallos cumplen funciones de almacenamiento de reservas en forma de azúcares y almidón.

Los resultados del presente trabajo respecto a la formación de tallos, evidencian una relación entre la dosificación de las cepas y el desarrollo de los mismos, con porcentajes de crecimiento positivos o negativos comparado con el testigo. El crecimiento de los tallos se evaluó por medio de la medición de su longitud, diámetro y peso.

Los mejores tratamientos para promover la longitud de tallo fueron el tratamiento 2 y 3 (cepas GBO3 10^8 UFC/ml. y IN937b 10^7 UFC/ml.) con 21.6 y 23.67 cm respectivamente (Cuadro 5), lo que significa un incremento del 19 y el 8% comparado con los 19.97 cm del testigo, por otra parte, los tratamientos 1 y 4 (GBO3 10^7 UFC/ml. y IN937b 10^8 UFC/ml.) presentaron medias inferiores al testigo con 18.6 y 16.5 cm que representan una longitud de un 7 y 17% por debajo del testigo, si bien los tallos de los tratamientos 1 y 4 presentaron longitudes menores, sus pesos y diámetros superaron al testigo (Cuadro 5).

Referente al peso del tallo, la totalidad de los tratamientos experimentales presentaron una media significativamente superior al testigo siendo los tratamientos 2 y 3 los de mayor peso con 4.62 y 3.99 gr respectivamente, mismos que equivalen a un incremento del 52 y 31% respecto a los 3.04 g del testigo (Cuadro 5). Respecto al diámetro del tallo el único tratamiento estadísticamente diferente del testigo fue el tratamiento 3 con un promedio de 0.6 cm, que representa un incremento del 20% respecto a los 0.5 cm del tratamiento testigo (Cuadro 5).

Los resultados obtenidos concuerdan con los de Araujo (2008), quien evaluó los efectos de una cepa de *Bacillus subtilis* en combinación con harina de ostras, encontrando un incremento del 34% respecto al testigo en las plantas inoculadas con *B. subtilis* y suplementadas con harina de ostras y un 19% en la inoculación de *B. subtilis* sin adición de harina de ostras, de acuerdo con el autor dicho incremento en la longitud de los tallos de maíz se debió principalmente a la solubilización de nutrientes como el fósforo, mismo que se encontraba en cantidades significativamente mayores en las hojas de las plantas inoculadas con *B. subtilis* comparadas con las del testigo, de igual manera, reporta una mayor concentración de las fosfatasas y un incremento en la concentración de nitrógeno en las plantas inoculadas. Los incrementos en el fósforo son importantes debido a que este elemento forma parte del ATP y por lo tanto su disponibilidad influye directamente en la disponibilidad de energía celular, mientras que el nitrógeno es un elemento esencial en la formación de biomasa vegetal.

Por lo antes mencionado, probablemente las plantas inoculadas con las cepas de *B. subtilis* presenten una mayor disponibilidad de nitrógeno y potasio, que permiten la formación de tallos con pesos más elevados, en lo que respecta a diámetros del tallo el único tratamiento con efectos significativos fue el tratamiento 3 que contenía la cepa IN937b a una concentración de 10^7 UFC/ml (Cuadro 5), es importante recalcar que este tratamiento presentó el mayor incremento en peso, por lo que la aplicación de la cepa IN937b a una concentración de 10^7 UFC/ml, puede considerarse la mejor dosis probada.

8.3. Peso total

Las diferencias en el peso total de los organismos sometidos a diferentes tratamientos son resultado de múltiples mecanismos de activación y estimulación simultáneos y nos permite observar y distinguir la efectividad de los mismos en la generación de biomasa, para el caso de maíz fue posible observar como la inoculación las cepas a diferentes concentraciones tuvieron un efecto en el crecimiento de las plantas. Dichos efectos son el resultado de la estimulación de la producción de raíces y partes aéreas.

Los resultados obtenidos muestran que la totalidad de los tratamientos experimentales presentaron una media significativamente superior al testigo (Cuadro 5) siendo los tratamientos 2 y 3 (cepas GBO3 10^8 UFC/ml y IN937b 10^7 UFC/ml) los de mayor peso total, ambos con 11.29 g, mismos que equivalen a un incremento del 72 % respecto a los 6.58 gr del testigo (Cuadro 5).

En el caso de *Bacillus subtilis*, se ha reportado la capacidad de las cepas para estimular a la planta por varios factores, el microorganismo tiene la capacidad de proteger a la planta de patógenos mediante competencia por recursos, antibiosis (Compant *et al.*, 2005; Siddiqui *et al.*, 2006; Mendes *et al.*, 2013), promueve la generación de resistencia sistémica (Siddiqui *et al.*, 2006; Bakker *et al.* 2007), promueve el crecimiento mediante la generación de fitohormonas (Bottini *et al.*, 2004; Ahmad *et al.*, 2008) y mediante la segregación de compuestos volátiles que activan la expresión de genes relacionados con la producción de auxinas y ácido abscísico (Ryu *et al.* 2003), incrementan la disponibilidad de potasio, nitrógeno y minerales en el suelo (Vessey, 2003; Pedraza, 2008; Hayat *et al.*, 2010), producción de sideróforos (Siddiqui *et al.*, 2006; Lee *et al.* 2008), produce la enzima 1-aminociclopropano 1-carboxilato (ACC) desaminasa, que hidroliza la ACC en amonio y alfa-ketobutirato evitando su conversión en etileno (Mayak *et al.* 1999; Marques *et al.* 2010).

El papel de la 1-Aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) es importante debido a que este es un precursor inmediato del etileno en plantas superiores, y por lo tanto, al suprimir su producción mediante la enzima ACC desaminasa, se evita la generación de etileno y con ello los procesos de senescencia derivados del mismo. Por lo que la inhibición del etileno es en sí un estímulo para el crecimiento. Por tanto, el incremento general del peso de la planta es el resultado de este conjunto de estímulos.

IX. CONCLUSIONES

Se determinó que las cepas GBO3 10^8 UFC/ml y IN937b 10^7 UFC/ml de *Bacillus subtilis* presentan un efecto positivo en el crecimiento del maíz (*Zea mays*).

La totalidad de los tratamientos experimentales presentaron un peso medio significativamente superior al testigo, no obstante, con los tratamientos GBO3 10^8 UFC/ml y IN937b 10^7 UFC/ml se obtuvieron los mejores resultados.

Respecto al peso de la raíz, la cepa que presentó la mayor promoción del crecimiento fue la GBO3 a una concentración de 10^8 UFC/ml.

En cuanto al crecimiento del tallo relativo a longitud, diámetro y peso, la mejor cepa fue IN937b a una concentración de 10^7 UFC/ml.

X.- RECOMENDACIONES

- Evaluar los efectos de las cepas utilizadas en este estudio a nivel de campo y determinar sus beneficios en el crecimiento y desarrollo de las plantas de maíz
- Realizar pruebas con la interacción de las dos cepas utilizadas en este estudio empleando las concentraciones óptimas.
- Dependiendo del interés de promover enraizamiento o crecimiento de la planta, utilizar la cepa que corresponda de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio.
- Evaluar los efectos de las cepas de *B. subtilis* GBO3 y IN937b en la germinación de semillas de maíz

XI. LITERATURA CITADA

- Aguado-Santacruz, G.A., Moreno-Gomez, B., Jimenez-Francisco, B., Garcia-Moya, E., Preciado-Ortiz, R.E., 2012. Impact of the microbial siderophores and phytosiderophores on the iron assimilation by plants: a synthesis. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35, 9-21.
- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M.S., 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research* 163, 173-181.
- Araujo, F. F. 2008. Seed inoculation with *Bacillus subtilis*, formulated with oyster meal and growth of corn, soybean and cotton. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 32, n. 2, p. 456-462, mar./abr., 2008.
- Asaka, O., Shoda, M., 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 4081-4085.
- Bach Álvarez, T., Díaz, M., 2008. Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en la agricultura. *Agricultura Orgánica* 3, 3.
- Bai, Y.M., Pan, B., Charles, T.C., Smith, D.L., 2002. Co-inoculation dose and root zone temperature for plant growth promoting rhizobacteria on soybean *Glycine max* (L.) Merr grown in soil-less media. *Soil Biology & Biochemistry* 34, 1953-1957.
- Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J., van Loon, L.C., 2007. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 97, 239-243.
- Bashan, Y., 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture.

Biotechnology Advances 16, 729-770.

Bashan, Y., de-Bashan, L.E., Donald, L.S., 2010. Chapter Two - How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth—A Critical Assessment, *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp. 77-136.

Benchabane M., Bakour R., Toua D., Boutekrabt A., 2000: Mise en évidence de l'effet antagoniste de *Pseudomonas fluorescens* vis-à-vis de la fusariose vasculaire de la tomate. *EPPO Bulletin*, 30: 243–246.

Boddey, R.M., Dobereiner, J., 1988. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals recent results and perspectives for future research. *Plant and Soil* 108, 53-66.

Bottini, R., Cassan, F., Piccoli, P., 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65, 497-503.

Calvo García, S., 2011. Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. *Biociencia* 3, 87.

Camelo, M., Vera, S.P., Bonilla, R.R., 2011. Mechanisms of action of plant growth promoting rhizobacteria. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 12, 8.

Canto-Martín, J.C., Medina-Peralta S. y Morales Avelino D. 2004. Efecto de la inoculación con *Azospirillum sp.* en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacquin). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 4 (2004): 21 – 27

Carrillo, C., Teruel, J.A., Aranda, F.J., Ortiz, A., 2003. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochimica et*

Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1611, 91-97.

Cattelan, A.J. 1999. Métodos cualitativos para determinación de características bioquímicas y fisiológicas asociadas con bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Londrina: EMBRAPA-CNPS,. 36 p.

Cattelan AJ, Hartel PG, Fuhrmann JJ (1999) Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci Soc Am J* 63:1670–1680

Chabot, R., Antoun, H., Cescas, M.P., 1996. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Plant and Soil* 184, 311-321.

Chanway CP. 1997. Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: an emerging technology for reforestation. *Forest Science*, 43 (1): 99-112

Chen, H., Wang, L., Su, C.X., Gong, G.H., Wang, P., Yu, Z.L., 2008. Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology* 47, 180-186.

Choudhary, D. K. • K. P. Sharma • R. K. Gaur 2011. Biotechnological perspectives of microbes in agro-ecosystems. *Biotechnol Lett* (2011) 33:1905–1910

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C., Barka, E.A., 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 4951-4959.

CICOPLAFEST (2004). Catálogo Oficial de Plaguicidas. México, 2004

- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C., Barka, E.A., 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 4951-4959.
- Dadnia, M.R., 2011. Effect of different strains of *Bacillus subtilis* on growth and grain yield of corn (*Zea mays* L.). *Research on Crops* 12, 360-363.
- De freitas, JR; MR Banerjee & JJ Germida. 1997. Phosphatesolubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol. Fertil. Soils* 24:358-364.
- Denef, K., Roobroeck, D., Wadu, M., Lootens, P., Boeckx, P., 2009. Microbial community composition and rhizodeposit-carbon assimilation in differently managed temperate grassland soils. *Soil Biology & Biochemistry* 41, 144-153.
- Denton, M.D., Pearce, D.J., Ballard, R.A., Hannah, M.C., Mutch, L.A., Norng, S., Slattery, J.F., 2009. A multi-site field evaluation of granular inoculants for legume nodulation. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 2508-2516.
- Earl, A.M., Losick, R., Kolter, R., 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology* 16, 269-275.
- Errington, J., 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology* 1, 117-126.
- Falardeau, J., Wise, C., Novitsky, L., Avis, T.J., 2013. Ecological and Mechanistic Insights Into the Direct and Indirect Antimicrobial Properties of *Bacillus subtilis* Lipopeptides on Plant Pathogens. *Journal of Chemical Ecology* 39, 869-878.

- Fahim, S., Dimitrov, K., Gancel, F., Vauchel, P., Jacques, P., Nikov, I., 2012. Impact of energy supply and oxygen transfer on selective lipopeptide production by *Bacillus subtilis* BBG21. *Bioresource Technology* 126, 1-6.
- FAO, 2011. *El Maíz en Los Trópicos: Mejoramiento y Producción* (Colección FAO: Producción y Protección Vegetal).
- Filippov, A.V. and Kuznetsova, M.A. 1994. Different influence of some biofungicides on dynamics of potato plant susceptibility to *Phytophthora infestans* (Mont.). *Mikologiya i Fitopatologiya* 28:64-69.
- Freeling, M., Walbot, V., Lane, B., 1994. *The Maize Leaf*, *The Maize Handbook*. Springer New York, pp. 17-28.
- García-olivares, J.; Moreno-Medina, V.; Rodríguez-Luna, I.; Mendoza-Herrera, A. y Mayek-Pérez, N. 2007. Efecto de cepas de *Azospirillum brasilense* en el crecimiento y rendimiento de maíz. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 30(3): 305-310, 2007.
- García R., Lovaisa N., Ulla E. 2015. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria in northwestern Argentina and its effect in promoting growth in maize (*Zea mays* L.). *Rev. Agron. Noroeste Argent.* (2015) 35 (1): 19-28
- González V., y S. Fragoso. 2002. Citado por Lisboa M. M. A. Tesis licenciatura. Efectividad de *Bacillus subtilis* y de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* Sobre la Incidencia y Severidad de Pudrición Gris (*Botrytis cinerea*) en *Vid vinífera*. Universidad de Talca Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Agronomía. Pp: 30.

- Graetz, H.A., Orozco, F., 1990. Suelos y fertilización / Basado En el Trabajo de H. A. Graetz .- 2 a. Ed.- México : Trillas : Secretaria de Educación Pública, pp. 80 (Serie manuales para educación agropecuaria. Área: suelos y agua; 34).
- Gutiérrez-Mañero FJ, Acero N, Lucas JA, Probanza A. 1996. The influence of native rhizobacteria on european alder (*Alnus glutinosa* L.) growth. Characterization and biological assays of metabolites from growth promoting and growth inhibiting bacteria. *Plant Soil*.182:67-74.
- Grobelak, A., Napora, A., Kacprzak, M., 2015. Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. *Ecological Engineering* 84, 22-28.
- Glick, B.R., 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41, 109-117.
- Glick, B.R., Pasternak, J.J., 2003. *Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA*. Third edition. Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA. Third edition, i.
- Glick, B.R., 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica* 2012, 963401.
- Hamdan, H., Weller, D.M., Thomashow, L.S., 1991. Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of gaeumannomyces-graminis-var-tritici by *Pseudomonas-fluorescens* 2-79 and m4-80r. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 3270-3277.
- Hamdache, A., Lamarti, A., Aleu, J., Collado, I., 2011. Non-peptide Metabolites from the genus *Bacillus*. *Journal of natural products* 74, 893-899.

- Habibi, S., Djedidi, S., Prongjunthuek, K., Mortuza, M.F., Ohkama-Ohtsu, N., Sekimoto, H., Yokoyama, T., 2014. Physiological and genetic characterization of rice nitrogen fixer PGPR isolated from rhizosphere soils of different crops. *Plant and Soil* 379, 51-66.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., Ahmed, I., 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology* 60, 579-598.
- Jayakumar, P., Tan, T., 2005. Phosphorus solubilization by ectomycorrhizal *Pisolithus tinctorius* in pure culture and in association with *Acacia mangium*. 39, 125-130.
- Jiménez, A., 2012. Beneficios del maíz en la salud: la vitamina B7 o biotina le aporta beneficios nutricionales al maíz, in: FENALCE (Ed.).
- Kinsella, K., Schulthess, C.P., Morris, T.F., Stuart, J.D., 2009. Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* 41, 374-379.
- Kloepper, J.W., Schroth, M.N., 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. . *Proceedings of the fourth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria* 2, pp. 879-892.
- Kloepper, J.W., M.N. Schroth y T.D. Miller. 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology* 70: 1078–1082.
- Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M.N., 1981. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 71, 231.

- Kloepper JW , 1992. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In FB Metting Jr, ed, *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management*. Marcel Dekker Inc., New York, pp 255-274.
- Kloepper, J.W., Rodríguez-Kábana, R., Zehnder, A.W., Murphy, J.F., Sikora, E., Fernández, C., 1999. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australasian Plant Pathology* 28, 21-26.
- Kloepper, J.W., Ryu, C.M., Zhang, S., 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94, 1259e1266.
- Kokalis-Burelle, N., Kloepper, J., Reddy, M., 2005. Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. *Applied Soil Ecology* 31, 91-100.
- Kumar, A., Prakash, A., Johri, B.N., 2011. *Bacillus* as PGPR in Crop Ecosystem, in: Maheshwari, D.K. (Ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*. Springer, New York, pp. 37-59.
- Leaungvutiviroj C, Ruangphisarn P, Hansanimitkul P, Shinkawa H, Sasaki K. Development of a new biofertilizer with a high capacity for N₂ fixation, phosphate and potassium solubilization and auxin production. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2010; 74(5): 1098-101.
- Leclere, V., Bechet, M., Adam, A., Guez, J.S., Wathelet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert, M., Jacques, P., 2005. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 4577-4584.

- Lee KJ, Kamala-Kannan S, Han SS, Seong CK, Lee GW (2008) Biological control of *Phytophthora* blight in red pepper (*Capsicum annuum* L.) using *Bacillus subtilis*. World J Microb Biotechnol 24:1139–1145
- Lucy, M., Reed, E., Glick, B.R., 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology 86, 1-25.
- Lugtenberg, B.J.J., Kravchenko, L.V., Simons, M., 1999. Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. Environmental Microbiology 1, 439-446.
- Lynch JM, Whipps JM, 1991. Substrate flow in the rhizosphere. In: Keister DL, Cregan PB (eds) The rhizosphere and plant growth. Kluwer, Dordrecht, pp 15–24
- Marques A., Pires C., Moreira H., António Rangel A., Castro P., 2010. Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. Biología del suelo y bioquímica. Volumen 42, Número 8 , agosto de 2010 , páginas 1229-1235
- Martinez, L.L., Peniche, R.A.M., Iturriaga, M.H., Medrano, S.M.A., Aguilar, J.R.P., 2013. Characterization of rhizobacteria isolated from tomato and their effect on tomato and bell pepper growth. Revista Fitotecnia Mexicana 36, 63-69.
- Mayak, S., Tivosh, T., Glick, B.R., 1999. Effect of wild type and mutant plant growth promoting rhizobacteria on the rooting of mung bean cuttings. Journal Plant Growth Regulation 18, 49e53.
- Mendes, R., Garbeva, P., Raaijmakers, J.M., 2013. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic

- microorganisms. *Fems Microbiology Reviews* 37, 634-663.
- Nemec, S., Datnoff, L.E. and Strandberg, J. 1996. Efficacy of biocontrol agents in plating mixes to colonize plant roots and control root. *Crop Protection* 15:735-742.
- Nieto KF, Frankenberger WT. Microbial productions of cytokinins. *Soil Biochemistry*. 1990;6:191-248.
- Ongena, M., Jacques, P., 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology* 16, 115-125.
- Osorio NW. 2007. A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. *Rev Fac Nat Agr Medellín*. 60(1):3621 43
- Paredes-Mendoza, M., Espinosa-Victoria, D., 2010. Organic Acids Produced by Phosphate Solubilizing Rhizobacteria: A Critical Review. *Terra Latinoamerica* 28,9.
- Park K.; Park, J-W.; Lee S-W. y Balaraju K. 2013. Disease suppression and growth promotion in cucumbers induced by integrating PGPR agent *Bacillus subtilis* strain B4 and chemical elicitor ASM. *Crop Protection* 54 (2013) 199e205
- Patten, C.L., Glick, B.R., 2002. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System, *Applied and environment microbiology*, pp. 3795-3801.
- Pedraza, R.O., 2008. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 125, 25-35.
- Perez-Garcia, A., Olalla, L., Rivera, E., Del Pino, D., Canovas, I., De Vicente, A.,

- Tores, J.A., 2001. Development of *Sphaerotheca fusca* on susceptible, resistant, and temperature-sensitive resistant melon cultivars. *Mycological Research* 105, 1216-1222.
- Perez-Montano, F., Alias-Villegas, C., Bellogin, R.A., del Cerro, P., Espuny, M.R., Jimenez-Guerrero, I., Lopez-Baena, F.J., Ollero, F.J., Cubo, T., 2014. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research* 169, 325-336.
- Prashar, P., Kapoor, N., Sachdeva, S., 2013. Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 1-15.
- Polania Fierro, M.G., 2014. Aspectos técnicos de la producción de maíz en Colombia: Importancia del cultivo de maíz, in: FENALCE (Ed.).
- Posada Uribe, L.F., 2012. Diseño conceptual del proceso productivos de cepa *Bacillus subtilis* EA-CB0575 para la promoción de crecimiento de Musa AAA., Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, Colombia, p. 151.
- Raaijmakers, J., Bruijn, D., Nybroe, O., Ongena, M., 2010a. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS, Microbiology Reviews* 34, 1037-1062.
- Raghavendra Joshi and Brian B. McSpadden Gardener, 2005. Identification and Characterization of Novel Genetic Markers Associated with Biological Control Activities in *Bacillus subtilis*. *The American Phytopathological Society*. Vol. 96, No. 2, 2006. 145-154

- Ramirez, C.A., Kloepper, J.W., 2010. Plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 depends on inoculum rate and P-related soil properties. *Biology and Fertility of Soils* 46, 835-844.
- Reyes, I.; Alvarez, L.; El-Ayoubi, H.; Valery, A. 2008. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro*, 20(1), pp. 37–48.
- Richardson, A., Barea, J.-M., McNeill, A., Prigent-Combaret, C., 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* 321, 305-339.
- Rodriguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., Bashan, Y., 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil* 287, 15-21.
- Rojas-Solís, D., Contreras-Pérez, M. y Santoyo G. 2013. Mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal en bacterias del género *Bacillus*. *Biológicas* Diciembre, 15(2): 36-41.
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Wei HX, Paré PW, Kloepper JW. 2003. “Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis” .Proceedings of the National Academy of Sciences USA 100:4927-4932
- Ryu C-M, Hu C-H, Reddy MS and Kloepper JW. 2003. Different signaling pathways of induced resistance by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana* against two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *New Phytologist*. 160:413-20.
- Ryu, C.M., John, F.M., Reddy, M.S., Kloepper, J.W., 2007. A two-strain mixture of rhizobacteria elicits induction of systemic resistance against *Pseudomonas*

sysringae and cucumber mosaic virus coupled to promotion of plant growth on *Arabidopsis thaliana*. *J. Micro. Biotech.* 17, 280e286.

Sánchez López, D.B., Gómez-Vargas, R.M., Garrido Rubiano, M.F., Bonilla Buitrago, R.R., 2012. Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3(7): 1401-15.

Santos, R.; Tapia, R.; Blanco, M.; González, R.; González, JL; Hernández, M.; Portilla, Y. 1996. Producción de reguladores del crecimiento vegetal por una cepa de *Azotobacter* sp. Universidad Central de Las Villas, La Habana (Cuba) Centro Agrícola. (Ene-Dic 1996). v. 23(1-3) p.39-45.

Santoyo G, Orozco-Mosqueda M, Govindappa M. 2012. “Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review” . *Biocontrol Science and Technology* 22:8, 855-872.

Sarabia Ochoa, M., Madrigal Pedraza, R., Martínez Trujillo, M., Carreón Abud, Y., 2010. Plantas, Hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas* 12, 65-71.

Schulz, B.E., Boyle, C.C., Sieber, T., Kloepper, J., Ryu, C.-M., 2006. Bacterial Endophytes as Elicitors of Induced Systemic Resistance, *Microbial Root Endophytes*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 33-52.

Siddiqui, Z., Antoun, H., Prévost, D., 2006. Ecology of Plant Growth Promoting Rhizobacteria, *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer Netherlands, pp. 1-38.

Sonenshein, A.L., 2000. Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Current*

- Opinion in Microbiology 3, 561-566.
- Stein, T., 2005. Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions. . Molecular Microbiology 56, 845-857.
- Swain MR, Naskar SK, Ray RC. Indole-3-acetic acid production and effect on sprouting of yam (*Dioscorea rotundata* L.)minisetts by *Bacillus subtilis* isolated from culturable cowdung microflora. Pol J Microbiol. 2007;56(2):103-10.
- Tejera-Hernández, Berto; Rojas-Badía, Marcia M.; Heydrich-Pérez, Mayra. 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos Revista CENIC. Ciencias Biológicas, vol. 42, núm. 3, septiembre-diciembre, pp. 131-138
- Terry Alfonso E., A. Leyva, A Hernández, 2005. Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. VII No. 2 Diciembre 2005 47-54
- Valery Alexis y Reyes Isbelia, 2013. Evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento bajo diferentes esquemas de fertilización en el cultivo de maíz variedad HIMECA-95. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XV No. 2 Diciembre 2013 80-88.
- Van Peer, R., G.J. Niemann y B. Schippers. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r. Phytopathology 81: 728-734.
- Vessey, J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil 255, 571-586.
- Wang X. Q., Zhao D. L., Shen L. L., Jing C. L. y Zhang, C. S. 2018 Application and

Mechanisms of *Bacillus subtilis* in Biological Control of Plant Disease. Springer
Nature Singapore Pte Ltd.p: 225-250

Xie, X., Zhang, H. & P., Pare (2009) Sustained growth promotion in Arabidopsis with
long-term exposure to the beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GB03).
Plant Signaling & Behavior, 4:10, 948-953

XII. ANEXOS

Anexo 1. Composición del medio de cultivo TSA (“Tryptic Soy Agar”, Merck®)

Reactivo	Cantidad (g/L)
Digerido pancreático de caseína	17
Digerido papaínico de soya	3
Cloruro de sódico	5
Fosfato dipotásico	2.5
Dextrosa	2.5
Agar	15

Anexos 2.- Resumen estadístico para Longitud de raíz

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
GBO3 10 ⁷ UFC/ml	18	67.92	20.84	30.68%	44.0	127.0	83.0
GBO3 10 ⁸ UFC/ml	12	82.75	17.77	21.48%	61.6	126.1	64.5
IN937b 10 ⁷ UFC/ml	18	75.96	13.67	18.00%	55.1	111.6	56.5
IN937b 10 ⁸ UFC/ml	18	78.17	21.08	26.97%	49.0	109.0	60.0
TESTIGO	18	73.03	18.32	25.08%	52.1	109.5	57.4
Total	84	75.05	18.75	24.98%	44.0	127.0	83.0

Anexo 3. Cuadro de sesgo estandarizado y/o la curtosis estandarizada

Tratamiento	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
GBO3 10 ⁷ UFC/ml	2.54	2.48
GBO3 10 ⁸ UFC/ml	2.06	1.58
IN937b 10 ⁷ UFC/ml	1.15	1.24
IN937b 10 ⁸ UFC/ml	0.43	-1.22
TESTIGO	1.63	-0.02
Total	2.73	0.30

Anexo 4.- Prueba de Kruskal-Wallis para Longitud Raíz por tratamiento

Tratamiento	Tamaño Muestra	Rango Promedio
T1	18	32.08
T2	12	52.29
T3	18	46.91
T4	18	45.55
T5	18	38.91

Estadístico = 6.47815 Valor-P = 0.166172

Anexo 5.- Pruebas de rangos múltiple para Longitud Raíz por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
T1	18	67.92	a
T5	18	73.03	bc
T3	18	75.96	bc
T4	18	78.17	bc
T2	12	82.75	c

Anexo 6.- Resumen Estadístico para Peso Raíz

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
GBO3 10 ⁷ UFC/ml	18	6.03	2.36	39.21%	2.17	9.78	7.61
GBO3 10 ⁸ UFC/ml	12	7.30	2.02	27.72%	4.55	11.09	6.54
IN937b 10 ⁷ UFC/ml	18	6.67	1.39	20.83%	4.45	9.53	5.08
IN937b 10 ⁸ UFC/ml	18	5.95	1.37	23.00%	3.65	9.2	5.55
TESTIGO	18	3.54	1.41	40.00%	1.16	7.27	6.11
Total	84	5.80	2.12	36.54%	1.16	11.09	9.93

Anexo 7.- ANOVA para Peso Raíz por tratamiento con un nivel del 95.0% de confianza.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	133.94	4	33.48	11.06	0.0000
Intra grupos	239.13	79	3.02		
Total (Corr.)	373.08	83			

Anexo 8- Pruebas de Rangos Múltiple para Peso Raíz por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
T5	18	3.54	a
T4	18	5.95	b
T1	18	6.03	bc
T3	18	6.67	bc
T2	12	7.30	c

Anexo 9- Tratamientos estadísticamente significativos para la variable Peso de Raíz

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
T1 – T2		-1.27	1.29
T1 – T3		-0.64	1.15
T1- T4		0.07	1.15
T1 – T5	*	2.48	1.15
T2 – T3		0.62	1.29
T2 – T4	*	1.34	1.29
T2 – T5	*	3.75	1.29
T3 – T4		0.71	1.15
T3 – T5	*	3.13	1.15
T4 – T5	*	2.41	1.15

* indica una diferencia significativa.

Anexo 10- Resumen estadístico para Longitud de Tallo

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
GBO3 10 ⁷ UFC/ml	18	18.6	1.98	10.67%	14.5	22.0	7.5
GBO3 10 ⁸ UFC/ml	12	21.60	3.86	17.89%	15.5	27.6	12.1
IN937b 10 ⁷ UFC/ml	18	23.67	3.15	13.31%	15.4	29.3	13.9
IN937b 10 ⁸ UFC/ml	18	16.51	3.44	20.83%	12.0	24.0	12.0
TESTIGO	18	19.97	4.18	20.96%	11.5	26.9	15.4
Total	84	19.96	4.14	20.77%	11.5	29.3	17.8

Anexo 11-ANOVA para Longitud de Tallo por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	528.05	4	132.01	11.59	0.0000
Intra grupos	899.69	79	11.38		
Total (Corr.)	1427.76	83			

Anexo 12- Pruebas de Rangos Múltiple para Longitud de Tallo por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
T4	18	16.51	a
T1	18	18.6	ab
T5	18	19.97	bc
T2	12	21.60	cd
T3	18	23.67	d

Anexo 13- Tratamientos estadísticamente significativos para la variable Longitud de Tallo

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
T1 – T2	*	-3.00	2.50
T1 – T3	*	-5.07	2.23
T1- T4		2.08	2.23
T1- T5		-1.37	2.23
T2 – T3		-2.06	2.50
T2- T4	*	5.09	2.50
T2 – T5		1.63	2.50
T3 – T4	*	7.16	2.23
T3 – T5	*	3.7	2.23
T4- T5	*	-3.46	2.23

* Indica una diferencia significativa.

Anexo 14- Resumen Estadístico para Diámetro de Tallo

TRATAMIENTO	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
GBO3 10 ⁷ UFC/ml	18	0.51	0.08	16.14%	0.34	0.63	0.29
GBO3 10 ⁸ UFC/ml	12	0.54	0.07	14.17%	0.45	0.72	0.27
IN937b 10 ⁷ UFC/ml	18	0.60	0.06	10.44%	0.51	0.74	0.23
IN937b 10 ⁸ UFC/ml	18	0.51	0.09	17.77%	0.34	0.69	0.35
TESTIGO	18	0.50	0.05	11.73%	0.44	0.61	0.17
Total	84	0.53	0.08	15.43%	0.34	0.74	0.4

Anexo 15- ANOVA para Diámetro de Tallo por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.11	4	0.02	5.08	0.0011
Intra grupos	0.45	79	0.00		
Total (Corr.)	0.56	83			

Anexo 16- Pruebas de rangos múltiple para Diámetro de Tallo por tratamiento
 Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
T5	18	0.50	a
T1	18	0.51	a
T4	18	0.51	a
T2	12	0.54	ab
T3	18	0.60	b

Anexo 17- Tratamientos estadísticamente significativos para la variable Diámetro de Tallo

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
T1 – T2		-0.03	0.05
T1 – T3	*	-0.09	0.05
T1 – T4		-0.00	0.05
T1 – T5		0.00	0.05
T2 – T3		-0.05	0.05
T2 – T4		0.03	0.05
T2 – T5		0.03	0.05
T3 – T4	*	0.08	0.05
T3 – T5	*	0.09	0.05
T4 – T5		0.00	0.05

* indica una diferencia significativa.

Anexo 18- Resumen Estadístico para Peso Tallo

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
GBO3 10 ⁷ UFC/ml	18	3.81	1.13	29.73%	2.33	6.97	4.64
GBO3 10 ⁸ UFC/ml	12	3.99	0.84	21.10%	2.65	5.16	2.51
IN937b 10 ⁷ UFC/ml	18	4.62	0.65	14.10%	3.51	6.22	2.71
IN937b 10 ⁸ UFC/ml	18	3.95	0.97	24.74%	2.52	5.97	3.45
TESTIGO	18	3.04	0.67	22.07%	1.47	3.99	2.52
Total	84	3.88	1.00	25.89%	1.47	6.97	5.5

Anexo 19- Tabla ANOVA para Peso Tallo por tratamiento con un nivel del 95.0% de confianza.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	22.89	4	5.72	7.42	0.0000
Intra grupos	60.92	79	0.77		
Total (Corr.)	83.82	83			

Anexo 20- Pruebas de Rangos Múltiple para Peso Tallo por tratamiento.

Método: 95.0 porcentaje LSD

TRATAMIENTO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
T5	18	3.04	a
T1	18	3.81	b
T4	18	3.95	b
T2	12	3.99	bc
T3	18	4.62	c

Anexo 21- Tratamientos estadísticamente significativos para la variable Peso de Tallo

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
T1- T2		-0.18	0.65
T1 – T3	*	-0.80	0.58
T1 – T4		-0.14	0.58
T1 – T5	*	0.77	0.58
T2 – T3		-0.62	0.65
T2 – T4		0.03	0.65
T2 – T5	*	0.95	0.65
T3 – T4	*	0.66	0.58
T3 – T5	*	1.58	0.58
T4 – T5	*	0.91	0.58

* indica una diferencia significativa.

Anexo 22- Resumen estadístico para Peso Total

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
GBO3 10 ⁷ UFC/ml	18	9.84	3.23	32.90%	4.55	14.67	10.12
GBO3 10 ⁸ UFC/ml	12	11.29	2.34	20.79%	7.2	14.8	7.6
IN937b 10 ⁷ UFC/ml	18	11.29	1.57	13.96%	8.41	14.09	5.68
IN937b 10 ⁸ UFC/ml	18	9.91	2.05	20.76%	6.22	13.91	7.69
TESTIGO	18	6.58	1.79	27.30%	4.23	10.76	6.53
Total	84	9.68	2.82	29.14%	4.23	14.8	10.57

Anexo 23.- ANOVA para Peso Total por tratamiento con un nivel del 95.0% de confianza.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	252.23	4	63.05	12.19	0.0000
Intra grupos	408.57	79	5.17		
Total (Corr.)	660.80	83			

Anexo 24.- Prueba de Rangos múltiples para Peso Total por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
T5	18	6.58	a
T1	18	9.84	b
T4	18	9.91	b
T3	18	11.29	b
T2	12	11.29	b

Anexo 25.- Tratamientos estadísticamente significativos para la variable Peso Total

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
T1 – T2		-1.45	1.68
T1 – T3		-1.45	1.50
T1 – T4		-0.07	1.50
T1 – T5	*	3.25	1.50
T2 – T3		0.00	1.68
T2 – T4		1.37	1.68
T2 – T5	*	4.71	1.68
T3 – T4		1.37	1.50
T3 – T5	*	4.71	1.50
T4 – T5	*	3.33	1.50

* indica una diferencia significativa.