

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida
con orientación en Microbiología**

**Bioprospección y caracterización de bacterias endófitas de *Solanum
hindsianum* como promotoras de crecimiento vegetal en solanáceas
de interés agrícola en Baja California**

Tesis para cubrir los requisitos necesarios para obtener el grado de Maestro en
Ciencias

Presenta:

Ana Guadalupe Corral Federico

Ensenada, Baja California, México
2021

Tesis defendida por

Ana Guadalupe Corral Federico

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo
Director de tesis

Miembros del comité

Dr. Rodrigo Méndez Alonso

Dr. Cuauhtémoc Turrent Thompson



Dra. Patricia Juárez Camacho
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Ana Guadalupe Corral Federico © 2021

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Ana Guadalupe Corral Federico** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología Celular y Molecular.

Bioprospección y caracterización de bacterias endófitas de *Solanum hindsianum* como promotoras de crecimiento vegetal en solanáceas de interés agrícola en Baja California

Resumen aprobado por:

Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo
Director de tesis

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) ayudan a las plantas a hacer frente a condiciones de estrés mediante distintos mecanismos, como la solubilización de nutrientes, la fijación de nitrógeno y la producción de fito-hormonas. Con el fin de encontrar alternativas a los fertilizantes químicos, se estudió el microbiota asociada a la solanácea endémica de Baja California *Solanum hindsianum*. Se lograron aislar 31 cepas bacterianas endófitas, las cuales fueron sometidos a una serie de pruebas para caracterizar su capacidad de solubilizar distintos nutrientes, producir ácido indol- 3- acético y biofilms, así como su tolerancia al estrés hídrico y salinidad. A continuación, mediante ensayos *in vitro* se determinó la variabilidad de los aislados bacterianos para promover la germinación en semillas de distintas solanáceas. Por último, se realizó un ensayo en invernadero inoculando plántulas de tomate, chile, berenjena y rábano con los aislados que habían mostrado mayor potencial. Las medidas morfométricas que se analizaron fue el largo de tallos y raíces, el diámetro del tallo a la altura de la corona, así como el peso seco para determinar el área por masa foliar (LMA) y el área específica de la raíz (RSL). Se encontraron aislados bacterianos pertenecientes al género *Pseudomonas* y *Bacillus*, capaces de promover el crecimiento en las distintas solanáceas. Los efectos se observaron principalmente a nivel de las raíces; las plantas de berenjenas fueron las plantas donde los efectos se dieron con mayor intensidad. Se proponen los aislados bacterianos endófitos *Pseudomonas* sp. EBCAb1, *Bacillus* sp. EBCAb9 y *Pseudomonas* sp. EBCAe10 como aislados potenciales para la formulación de biofertilizantes aplicados en zonas de suelos áridos.

Palabras clave: PGPR, *Solanum hindsianum*, Solanaceae, suelos áridos

Abstract of the thesis presented by **Ana Guadalupe Corral Federico** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life in Sciences with orientation in Microbiology.

Bioprospection and characterization of endophytic bacteria from *Solanum hindsianum* as plant growth promoters in Solanaceae of agricultural interest in Baja California

Abstract approved by:

Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo
Thesis Director

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) help plants to cope with stress conditions through different mechanisms, such as nutrient solubilization, nitrogen fixation, and phytohormone production. In order to find alternatives to chemical fertilizers, the microbiota associated with the endemic Baja Californian Solanaceae *Solanum hindsianum* was studied. 31 endophytic bacterial strains were isolated, which were subjected to a series of tests to characterize their ability to solubilize different nutrients, produce indole-3-acetic acid and biofilms, as well as their tolerance to water stress and salinity. Then, through *in vitro* tests, the variability of the bacterial isolates was determined to promote germination in seeds of different Solanaceae. Finally, a greenhouse assay was carried out, inoculating tomato, chile, eggplant and radish seedlings with the isolates that had shown the greatest potential. The morphometric measurements that were analyzed were the length of stems and roots, the diameter of the stem at the height of the crown, as well as the dry weight to determine the area per leaf mass (AML) and the specific area of the root (RSL). Bacterial isolates belonging to the genus *Pseudomonas* and *Bacillus* were found capable of promoting growth in the different Solanaceae. The effects were mainly observed at the root level; the eggplants were the crop where the effects occurred with greater intensity. The endophytic bacterial isolates *Pseudomonas* sp. EBCAb1, *Bacillus* sp. EBCAb9 and *Pseudomonas* sp. EBCAe10 are proposed as potential isolates for the formulation of biofertilizers applied in arid soil areas.

Keywords: PGPR, *Solanum hindsianum*, Solanaceae, arid soils

Dedicatoria

A mi hijo Diego, “que tus sueños siempre sean más grandes que tus miedos...”

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por darme la oportunidad para realizar mi maestría en esta institución.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico durante mi estancia en la maestría.

Al departamento de Microbiología de CICESE y al grupo de fitopatología, por ayudarme a crecer en esta etapa, sobre todo la parte de los seminarios.

A los miembros de mi comité. Al Dr. Rodrigo Méndez por sus aportes para mejorar el proyecto y apoyo en el diseño de los ensayos de invernadero. Al Dr. Cuauhtémoc por sus revisiones y observaciones.

A Sheila Ramírez, por el procesamiento de las muestras de la colecta del 2019.

Al Dr. Edgardo Sepúlveda por haber estado incondicionalmente a lo largo de mi proyecto y compartirme sus experiencias académicas.

A Victoria por haberme compartido su fascinación por la microbiología y ser parte de mi motivación también.

A Paola, Reina, Neri, Iliana y Lynneth, gracias amigos por echarme porras.

A Mariana, gracias por haber estado conmigo a lo largo de esta travesía y ser mi apoyo en los momentos agobiantes.

A mi familia, a mi madre que siempre ha creído en mí.

A mi hijo Diego, por tenerme paciencia a lo largo de estos dos años y aceptar quedarse en la guardería.

A Dios, por siempre mostrarme su gracia.

Tabla de contenido

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimiento.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	x

Capítulo 1. Introducción

1.1. Antecedentes.....	1
1.1.1. Aspectos generales de las PGPR	1
1.1.2. PGPR rizosféricas y endofíticas	1
1.1.3. Las PGPR en ambientes áridos y su importancia como fijadoras de nitrógeno	2
1.1.4. Establecimiento de la relación planta- bacteria	2
1.1.5. Aportaciones de las PGPR en la agricultura	4
1.1.6. Producción de cultivos de solanáceas en México y cultivos en Baja California.....	4
1.1.7. <i>Solanum hindisanum</i> Benth	6
1.1.8. Antecedentes de aislamiento de PGPR en México	6
1.2. Justificación	7
1.3. Hipótesis	8
1.4. Objetivos.....	8
1.4.1 Objetivo general.....	8
1.4.2. Objetivos específicos	8

Capítulo 2. Metodología

2.1. Colecta de muestras	9
2.2. Procesamiento de muestras	10
2.3. Inoculación en medios.....	10
2.3.1. Preparación de medios	10
2.3.2. Inoculación y aislamiento en medios sólidos y semisólidos	11
2.4. Caracterización de los aislados como promotores de crecimiento y antagonistas	12
2.4.1. Prueba de solubilización de zinc	12
2.4.2. Prueba de solubilización de potasio	13
2.4.3. Prueba de solubilización de fosforo.....	13

2.4.4. Evaluación cualitativa in vitro de la actividad antagónica de los aislados sobre <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i> raza 1	14
2.4.5. Evaluación cuantitativa in vitro de la actividad antagónica de los aislados ante <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i> raza 1	14
2.4.6. Cuantificación de producción del Ácido indol acético (AIA)	15
2.4.7. Cuantificación de la producción de biofilm	15
2.4.8. Evaluación de la respuesta ante el estrés hídrico (estrés osmótico).....	16
2.4.9. Evaluación de la respuesta a estrés por salinidad	16
2.5. Identificación molecular mediante la secuenciación del gen RNAr 16s.....	17
2.6. Detección del gen <i>nifH</i> en aislados obtenidos a partir de medios selectivos para diazótrofos	18
2.7. Evaluación de los aislados sobre la germinación en semillas de Solanáceas: tomate (<i>S. lycopersicum</i> variedad <i>Bonnie best</i>), chile serrano (<i>C. annuum</i>) y berenjena (<i>S. melongena</i>).....	19
2.8. Evaluación del efecto de los aislados en solanáceas de interés agrícola mediante ensayos de invernadero.....	20
2.8.1. Germinación de semillas.....	20
2.8.2. Preparación del inóculo e inoculación de plántulas.....	20
2.8.3. Procesamiento de muestras y análisis estadístico.....	21
Capítulo 3. Resultados	
3.1. Aislamiento de bacterias endófitas de <i>Solanum hindsianum</i>	23
3.2. Evaluación <i>in vitro</i> de las características de promoción de crecimiento vegetal de los aislados.....	24
3.3. Evaluación de la tolerancia al estrés hídrico (estrés osmótico)	27
3.4. Evaluación de la tolerancia a la salinidad	29
3.5. Identificación de los aislados mediante la secuenciación del gen RNAr 16s.....	31
3.6. Detección del gen <i>nifH</i> en diazótrofes de vida libre	32
3.7. Ensayos <i>in vitro</i> de germinación en semillas de solanáceas.....	32
3.8. Variabilidad de la promoción del crecimiento en distintas solanáceas mediante ensayos <i>in vivo</i> en condiciones de invernadero.....	36
3.8.1. Evaluación del efecto de los aislados sobre plantas de rábano.....	36
3.8.2. Evaluación del efecto de los aislados sobre plantas de tomate	37
3.8.3. Evaluación del efecto de los aislados sobre plantas de chile	40
3.8.4. Evaluación del efecto de los aislados sobre plantas de berenjena.....	42
Capítulo 4. Discusión	45
Capítulo 5. Conclusiones	50

Literatura citada51

Anexos.....58

Lista de figuras

Figura		Página
1	Ejemplo de los resultados obtenidos de las pruebas colorimétricas de solubilización de nutrientes	25
2	Ejemplos de los ensayos de antagonismo mediante ensayos duales.....	26
3	Resultados de los ensayos duales en la evaluación de antagonismo.....	27
4	Resultados de la evaluación al estrés hídrico en los aislados potenciales como PGPR.....	28
5	Resultados de la evaluación a la resistencia por salinidad en los aislados potenciales como PGPR	30
6	Gel de electroforesis con amplificación del gen <i>nifH</i>	32
7	Diagramas de caja para las mediciones de los tejidos de plántulas de tomate.....	33
8	Diagramas de caja para las mediciones de plántulas de chile serrano.....	34
9	Diagramas de caja para las mediciones de tejidos de plántulas de berenjena.....	35
10	Diagramas de cajas para las mediciones de los parámetros morfométricos en plantas de rábano.....	36
11	Diagramas de cajas para las mediciones de los parámetros morfométricos en plantas de tomate.....	38
12	Raíces de tomate procesadas por tratamientos previo al secado.....	39
13	Diagramas de cajas para las mediciones de los parámetros morfométricos en plantas de chile.....	40
14	Raíces de chile procesadas por tratamientos previo al secado.....	41
15	Diagramas de cajas para las mediciones de los parámetros morfométricos en plantas de berenjena.....	43
16	Raíces de berenjena procesadas por tratamientos previo al secado.....	44

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Ubicación de las colectas vegetales.....	9
2	Aislados bacterianos obtenidos de los sitios de colecta	23
3	Resultados de las pruebas colorimétricas, cuantificación de AIA y biofilm, y actividad antagónica.....	24
4	Resultados de la secuenciación del gen RNAr 16s, primer 27F.....	31
5	Porcentajes de germinación de semillas de tomate <i>Bonnie best</i>	33
6	Porcentajes de germinación de semillas en chile serrano.....	34
7	Porcentajes de germinación de semillas de Berenjena.....	35
8	Tasa de cambio de la relación de los parámetros morfométricos comparando con el tratamiento control en plantas de rábano por tratamiento de aislado bacteriano.....	37
9	Tasa de cambio de la relación de los parámetros morfométricos comparando con el tratamiento control en plantas de tomate por tratamiento de aislado bacteriano.....	38
10	Tasa de cambio de la relación de los parámetros morfométricos comparando con el tratamiento control en plantas de chile por tratamiento de aislado bacteriano.....	41
11	Tasa de cambio de la relación de los parámetros morfométricos comparando con el tratamiento control en plantas de berenjena por tratamiento de aislado bacteriano...	43
12	Parámetros morfométricos de plantas de rábano.....	58
13	Parámetros morfométricos de plantas de tomate (<i>Bonnie best</i>).....	58
14	Parámetros morfométricos de plantas de chile serrano.....	58
15	Parámetros morfométricos de plantas de berenjena.....	59
16	Resumen de las características de aislados diazótrofos.....	60

Capítulo 1. Introducción

1.1. Antecedentes

1.1.1. Aspectos generales de las PGPR

La región del suelo que rodea las raíces de las plantas se define como la rizosfera, y en esta región se producen interacciones entre las raíces, los microorganismos y las condiciones físicoquímicas del suelo (Hartman et al., 2009; Ingraham e Ingraham, 1998). Los microorganismos, específicamente las bacterias, pueden impactar la nutrición de las plantas de manera positiva al mejorar la disponibilidad y absorción de nutrientes, dando como resultado la promoción de crecimiento, y la supresión de patógenos mediante distintos mecanismos (Berg y Smalla, 2009; Richardson et al., 2009; Kawasaki et al., 2016). Las bacterias que se encuentran alrededor de los tejidos vegetales realizando estas contribuciones se conocen como Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal, o PGPR por sus siglas en inglés.

Entre los mecanismos de acción que poseen las PGPR está la producción de fitohormonas (ácido indol acético, giberelinas, ácido abscísico, poliaminas, y citocinas), la fijación del nitrógeno y el aumento de la disponibilidad de nutrientes mediante la solubilización de fosfatos y la facilitación de absorción del hierro, entre otros (Bashan y De- Bashan, 2010; Cassan y Diaz- Zorita, 2016). Estas actividades se presentan de manera simultánea o de manera sucesiva, resultando en cambios observados en el crecimiento de la planta (Bashan y Lavanony, 1990; Bashan y De- Bashan, 2010).

1.1.2. PGPR rizosféricas y endofíticas

Para estimular el crecimiento vegetal, las PGPR necesitan entrar en contacto directo con su planta hospedera. El grado de cercanía espacial de las PGPR y su hospedero vegetal se puede categorizar en dos niveles de complejidad: rizosféricas y endofíticas (Vessey, 2003).

En cuanto a las relaciones rizosféricas, los generos *Azotobater* y *Azospirillum* han sido dos de los géneros más estudiados en esta categoría gracias a las diferentes contribuciones que pueden llegar a ejercer hacia su planta hospedera, además de la fijación de nitrógeno son capaces de sintetizar fitohormonas (Bashan y De- Bashan, 2010; Vikhe, 2014). Particularmente, se ha demostrado que *Azospirillum* produce de manera eficiente el ácido indol-3-acético (AIA), una hormona de crecimiento

vegetal, y adicionalmente dispara la resistencia sistémica inducida, la cual le proporciona a la planta mejor capacidad de respuesta para hacer frente eficientemente a la infección por fitopatógenos (Martínez et al., 2015).

En el caso de las relaciones endófitas, las bacterias colonizan el interior de los tejidos desde el suelo de la rizosfera al interior de la planta, en muchos casos, a través de la unión de las raíces laterales a las primarias mediante los espacios apoplásticos del hospedero vegetal (Andersen, 2013). Una vez que colonizan el interior de la planta son capaces de adaptarse y persistir en la zona de la rizosfera, e incluso migrar hacia otros tejidos (Barreto et al., 2007).

Las bacterias endófitas juegan un rol importante en la inducción de Resistencia Sistémica Inducida (IRS) contra fitopatógenos, esta incluye la producción de compuestos volátiles orgánicos con un amplio espectro contra hongos, bacterias y nematodos (Sheoran et al., 2015), así como la producción de sideróforos, los cuales son compuestos quelantes de hierro (Arora et al., 2001).

1.1.3. Las PGPR en ambientes áridos y su importancia como fijadoras de nitrógeno

En ambientes áridos las plantas son capaces de hacer frente a condiciones desfavorables gracias a la acción de estrategias de adaptación de su microbiota. Entre las estrategias destacan la producción ácido indol-3-acético (AIA), una de las fitohormonas mejor caracterizadas en bacterias rizosféricas. Estimula el crecimiento de la raíz y aumenta la densidad de pelos radicales y raíces laterales, siendo el triptófano la principal molécula precursora en la biosíntesis de esta hormona (Gray y Smith, 2005; Etesami et al., 2009). En la rizosfera las bacterias se encuentran agregadas en una biopelícula aglutinada por una sustancia de polímeros, mejor conocida como "biofilm", que en condiciones ambientales adversas les otorga protección frente a pHs bajos, alta salinidad y acumulación de metales pesados (Gupta et al., 2017).

Adicionalmente, muchos suelos del mundo presentan una deficiencia de nitrógeno, y la asociación simbiótica entre plantas y bacterias fijadoras de nitrógeno, conocidas como diazótrofas, aumenta el nivel de este nutriente (Soussi et al., 2016). El nitrógeno, constituyente principal de aminoácidos, proteínas, nucleótidos, coenzimas y clorofila, es un nutriente esencial (Raven et al., 1992). A pesar de que es uno de los elementos más comunes del planeta su producción frecuentemente se ve limitada en los cultivos debido a que las plantas son incapaces de asimilar directamente el nitrógeno en su forma atmosférica (N_2),

por la estabilidad de un triple enlace que presenta su estructura molecular (Azcón- Bieto y Talón, 2008). La dinámica de este elemento en el suelo está regulada por procesos biológicos derivados de la actividad microbiana del suelo para su mineralización, nitrificación, amonificación y desnitrificación (Perdomo et al., 2000).

La fijación biológica del nitrógeno en parte es llevada a cabo por bacterias diazótrofes, ya sea rizoféricas o endófitas, así como de vida libre o simbióticas (Parsons y Sunley, 2001). El proceso está mediado por la enzima nitrogenasa reductasa, la cual cataliza la conversión del nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_3), una forma asimilable para las plantas (Ureta y Norlund, 2002). La enzima está conformada por dos proteínas: una proteína que contiene hierro (proteína-Fe) y otra que contiene molibdeno y hierro (proteína Mo-Fe). El complejo de la nitrogenasa es altamente sensible a oxígeno, por lo que las bacterias diazótrofes de vida libre tienen estrategias para hacer frente a este problema. Por ejemplo, la especie *Azotobacter vinelandii* es capaz de fijar nitrógeno por medio de dos nitrogenasas: una que contienen vanadio, que tolera mayores concentraciones de oxígeno, y otra que contiene hierro (Espín, 2003).

1.1.4. Establecimiento de la relación planta- bacteria

Los beneficios que reciben las plantas por parte de las PGPR varían según el hospedero vegetal y el tejido de la planta que puedan llegar a colonizar. En el proceso de colonización están involucrados factores genéticos, incluso morfológicos y fisiológicos, los cuales contribuyen a la colonización de bacterias endófitas (Adams et al., 2002).

La colonización inicia en la rizosfera, la cual es una zona altamente dinámica. El proceso de migración de las poblaciones bacterianas a las raíces inicia en respuesta a la liberación de compuestos orgánicos liberados por la planta. Estos exudados vegetales están compuestos principalmente de aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos, compuestos orgánicos fenólicos, azúcares y vitaminas (Uren, 2007). El efecto rizosférico implica la capacidad de los exudados para actuar como quimios atrayentes de las comunidades microbianas (Hardoim et al., 2008; Ramos et al., 2018).

Se ha reportado que las plantas son capaces de establecer inmediatamente comunidades umbral de bacterias endófitas posterior a la germinación, dado que compiten por un nicho y nutrientes, lo que provoca cambios constantes en la estructura de las comunidades bacterianas en la rizosfera; este umbral

no solo puede verse afectado por factores ambientales, sino aparentemente también por el tipo de cultivo (Hallmann et al., 1997; Adams et al., 2002).

1.1.5. Aportaciones de las PGPR en la agricultura

En la agricultura y la horticultura son los campos donde más investigación se ha realizado sobre PGPR, con el fin de desarrollar bio productos eficientes como los biofertilizantes y biopesticidas. El uso de biofertilizantes alude al empleo de microorganismos del suelo aplicados a semillas, superficies vegetales, o suelo, donde los microorganismos colonizan la rizosfera o el interior del organismo vegetal, aumentando la disponibilidad y consumo de nutrientes minerales. Actúan de manera directa suministrando nutrientes a su planta hospedera, o de manera indirecta influenciado positivamente el crecimiento de la raíz y su morfología, así como la estimulación de otras relaciones benéficas (Vessey, 2003). De igual manera, las PGPR tienen aplicación como biopesticidas, favoreciendo el control sobre organismos fitopatógenos (Whipps, 2001).

Los beneficios que se han observado al suplementar plantas con PGPR incluye la estimulación de la síntesis de sustancias reguladoras de crecimiento, la fijación de nitrógeno, la solubilización de nutrientes, la producción de sideróforos y el control de fitopatógenos, dando como resultado la promoción de crecimiento. Algunos de los géneros estudiados para su aplicación con fines agrícolas han sido: *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Beijerinckii*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Anabaena*, *Nostoc* y *Arthrobacter* (Riveros- Angarita et al., 2010).

1.1.6. Producción de cultivos de solanáceas en México y cultivos en Baja California

La familia Solanácea incluye importantes plantas con relevancia agrícola, como la papa (*Solanum tuberosum* L.), el chile (*Capsicum* spp.), el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y los tomatillos (*Physalis philadelphica* Lam.). En México hay 34 géneros de esta familia, de la que se derivan 381 especies y 18 variedades (Martínez et al., 2017).

El cultivo de tomate es uno de los cultivos de hortalizas más populares y de mayor consumo a nivel mundial (Grandillo et al., 1999). De acuerdo a la FAO, en el 2019 se produjeron 180,766, 329 toneladas en

un área de 5, 030, 545 ha a nivel mundial; México ocupó el noveno lugar con una producción de 4, 271, 914 toneladas en un área de 87, 917 ha (FAO, 2019). Su distribución nativa se da en los estados de Aguascalientes, Colima, Durango, Guanajuato, Jalisco, Nayarit, Michoacán, y Oaxaca (Martínez et al., 2017). En Baja California el tomate rojo es el principal cultivo vegetal de producción, representando el 22.4% de producción agrícola total del estado (Borja- Bravo et al., 2013; Delgado et al., 2020). Los principales sitios donde se siembra son San Quintín, Maneadero, San Vicente y Ojos Negros (SADER, 2020). En San Vicente y San Quintín el clima es muy árido, árido y templado con temperatura media anual entre 12°C y 18°C y el mes más caliente de 22° C, siendo la temperatura del mes más frío de entre -3° y 18° C, las lluvias ocurren en invierno, con suelo de composición de calcisol- pétrico y arenosol haplítico (Arriaga-Cabrera, 2000). El valle de Ojos negro presenta un clima semiárido, tipo mediterráneo, de igual manera las lluvias ocurren en invierno y la temperatura media anual es de 18.7° C, con máximas y mínimas de 52.8 y -4° C respectivamente (Venegas Cardoso y López García, 2005).

De Chile, incluyendo picantes y pimientos verdes, a nivel mundial en el 2019 se cosecharon 38, 027, 164 toneladas en un área de 1,990,926 ha. México ocupó el segundo lugar como productor de este cultivo después de China, cosechando 3, 238, 245 toneladas en un área de 149, 577 ha (FAO, 2019). Existen diferentes variedades de la especie *Capsicum annum* en el país, siendo Baja California, Baja California Sur, Campeche, Jalisco, Oaxaca, Veracruz, Puebla, Quintana Roo, Querétaro, Tamaulipas, Chihuahua, Nuevo León y Chiapas, los estados con distribución nativa (Martínez et al., 2017).

En cuanto al cultivo de la berenjena (*Solanum melongena* L.), en el 2019 a nivel mundial se cosecharon 55, 197, 878 toneladas en un área de 1, 847, 787 ha (FAO, 2019). De acuerdo al FIRCO (2018), en ese año México ocupó el doceavo lugar como productor a nivel mundial, produciendo 138, 214 toneladas. Sinaloa tiene la mayor superficie de cultivo con 2, 101 ha distribuidas en cinco municipios y una producción de 162, 557 toneladas al año. Después se encuentran los estados de Querétaro y Sonora con una producción anual de 4, 470 y 3, 355 toneladas de producción respectivamente (FIRCO, 2018).

En el estado de Baja California al 2019 se sembraron 131,783.93 ha de diversos cultivos como el trigo, algodón hueso, avena forrajera, cebolla, cebada, sorgo, variedades de tomate, fresa, chile, chícharo, especias, entre otras (SIAP, 2019).

1.1.7. *Solanum hindisanum* Benth

Solanum hindisianum, tradicionalmente conocida en México como “Mariola”, es un arbusto de la familia solanácea. Es nativa del desierto Sonorense y también puede encontrarse en el desierto central de Baja California (Chiang, 2009). Crece y florece bien en condiciones áridas, teniendo una tolerancia significativa a las condiciones ambientales extremas que predominan en algunas zonas de la península Baja Californiana. Se le encuentra en ecosistemas de matorral xerófilo y en bosque tropical caducifolio y/o espinoso, en zonas con suelos mayormente bien drenados o sitios con grava a lo largo de arroyos y laderas (Little, 2011).

En cuanto al fenotipo de la planta, los tallos jóvenes son de color verde amarillento pálido; llegan a presentarse espinas de color marrón rojizo y en el caso de los tallos más viejos la corteza es marrón a grisácea o marrón rojizo. Presenta hojas simples, de 2-3 cm de largo, ovaladas a elípticas y de apariencia secas verde amarillento a verde pálido. La planta tiene inflorescencias terminales o laterales no ramificadas, de 3-4 flores por lado color violeta, y cuando se secan son de color marrón a amarillento-claro (Knapp et al., 2017).

1.1.8. Antecedentes de aislamiento de PGPR en México

Existen antecedentes de aislamientos de PGPR realizados en zonas áridas de México. En el estado de Guanajuato, en el área natural protegida “Las Cruces”, García y Luna (2017) aislaron bacterias de la rizosfera de árboles de mezquite (*Prosopis laevigata*), encino (*Quercus rugosa*), y ciruelillo (*Embothrium coccineum*), logrando aislar 100 cepas en medio selectivo ACC desaminasa. De éstas, 35 cepas promovieron la germinación en semillas de lentejas (*Lens culinaris*) y rábano (*Rabhanus sativus*), 5 mostraron resistencia a hongos fitopatógenos (*Fusarium oxysporum*, *Alternaria sp.*, y *Bipolaris sp.*) y en 17 se observó producción de sideróforos.

Aguirre- Garrido y colaboradores (2012) evaluaron la diversidad y composición de las comunidades bacterianas del suelo a granel y la rizosfera de tres especies de cactus: *Mammillaria carnea*, *Opuntia pilifera* y *Stenocereus setllatus*, provenientes de la reserva de la biosfera de Tehuacán-Cuicatlán en el centro de México. Encontraron que la composición de los géneros era muy similar en distintas estaciones, destacando aquellos del género: *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Herbaspirillum*, *Massilia*, *Sinomas*, *Leifsonia*, y *Ochrobactrum*.

En un estudio realizado mediante colectas en el sistema costero en La Paz, B. C.S., Rueda-Puente y colaboradores (2018) analizaron la comunidad microbiana de la rizosfera de la especie *Salicornia bigelovii*, una halófito con un promisorio valor biológico y comercial en zonas áridas y cuya productividad depende de las aportaciones de nitrógeno. Encontraron una alta diversidad de comunidades bacterianas, con poblaciones dominantes del género *Rhizobium* spp. y *Bacillus* spp.

Recientemente, Delgado-Ramírez (2020), aisló PGPR del suelo de la rizosfera de la solanácea endémica *Solanum hindsianum* a lo largo de la península de Baja California. Mediante pruebas de caracterización de crecimiento vegetal y antagonismo contra hongos fitopatógenos, identificó bacterias del género *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, y *Streptomyces* capaces de promover el crecimiento de tomate y de reducir el daño producido por el hongo de importancia en la región *Fusarium lycopersicum* F. sp. *Lycopersici*.

Es importante mencionar que en Baja California no se ha realizado el aislamiento de PGPR endófitas provenientes de plantas con distribución nativas, como es el caso de *S. hindsianum*. Más aún, no se han evaluado los efectos que pueden llegar a tener sobre hospederos vegetales de otras especies de la familia Solanaceae.

1.2. Justificación

Hoy en día la producción de cultivos presenta grandes retos. Principalmente, existe la necesidad de lograr el aumento de demanda de producción correspondiente al desarrollo demográfico de manera sostenible, evitando el uso de los agroquímicos y fertilizantes sintéticos tóxicos utilizados de manera habitual en la agricultura tradicional.

La producción sostenible consiste en fomentar el uso eficiente de recursos, así como minimizar el daño al medio ambiente. Es importante encontrar alternativas como lo son los biofertilizantes que mediante diferentes funciones promueven el crecimiento en organismos vegetales. El aislamiento de PGPR adaptados a las condiciones climáticas de la región es una alternativa prometedora, por ende, las bacterias asociadas a cultivos nativos relacionados con aquellos de interés agrícola son sustitutos potenciales.

1.3. Hipótesis

Las PGPR endófitas de la solanácea nativa *Solanum hindsianum* tienen efectos positivos en el crecimiento de solanáceas de interés agrícola como el tomate, la berenjena y el chile.

1.4. Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Aislar, caracterizar y determinar el potencial de bacterias endófitas de vida libre de *Solanum hindsianum* como promotoras de crecimiento vegetal.

1.4.2. Objetivos específicos

- Aislar bacterias endófitas de vida libre.
- Caracterizar los microorganismos mediante pruebas bioquímicas y microbiológicas como promotores de crecimiento vegetal.
- Identificar los aislados mediante pruebas moleculares.
- Confirmar la presencia de genes relacionados a la fijación de nitrógeno en cepas aisladas a partir de medios selectivos para bacterias diazótroficas.
- Determinar la variabilidad de los aislados bacterianos como promotores de crecimiento vegetal en diferentes solanáceas de interés agrícola.

Capítulo 2. Metodología

2.1. Colecta de muestras

El primer muestreo de *S. hindsuanum* se realizó en el 2019 mediante transectos en la parte central de la península de Baja California. El segundo en septiembre del 2020, en Bahía de los Ángeles, B.C. y en el ejido San Lucas, ubicado a 15 km al sur de Santa Rosalía B.C.S. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico con cierre hermético y se mantuvieron en hielo hasta su procesamiento. En la tabla 1 se muestran el lugar de origen de las muestras y las coordenadas de la ubicación:

Tabla 1. Ubicación de las colectas vegetales.

Código del sitio	Lugar de muestreo	Ubicación geográfica
S1	Ramona	29°54'03"N 115°06'13"W
S2	Jaraguay	29°37'18"N 114°34'57"W
S3	Carretera Guerrero Negro- La Nueva Odisea	29°27'40"N 114°26'49"W
S4	Codornices	29°11'43"N 114°16'52"W
S5	La Tinaja	28°46'51"N 113°40'18"W
S6	La Tinaja	28°47'18"N 113°38'51"W
S7	San Ignacio	28°44'25"N 113°53'32"W
S8	Santa Margarita	28°09'03"N 113°36'26"W
S9	Campo Alemán	28°05'07"N 113°31'35"W
S10	La Lagunita	28°15'46"N 113°08'44"W
S11	Santa Ana	29°03'29"N 114°02'47"W
S12	Chapala	29°27'04"N 114°20'02"W
S13	Chapala	29°27'53"N 114°20'09"W
S14	Asamblea	29°30'55"N 114°17'50"W
S20	Bahía de los Ángeles	29°03'55.9"N 114°01'37.5"W
S21	Ejido San Lucas	27°13'20.0"N 112°13'26.0"W

2.2. Procesamiento de muestras

Se retiró el suelo de las raíces mediante enjuagues con agua de la llave y con una navaja se realizaron cortes de los tejidos. Las hojas y tallos se colocaron juntos y las raíces aparte. Se utilizaron de 3-5 hojas, 5 cm de raíz, 5 cm de tallo joven y 5 cm de tallo más longevo, reconociéndose por el color y la altura a la que se encontraban de la planta. Se depositaron los tejidos en tubos falcón de 50 ml y se procedió al protocolo de esterilización de tejidos, el cual consistió en sumergir los tejidos en etanol al 70% por un minuto, se retiró y se sumergieron en hipoclorito de sodio al 10% por 5 minutos, se retiró y se sumergieron nuevamente en etanol al 70% por 30 segundos. Para retirar el etanol, se realizaron 3 enjuagues seguidos con agua destilada estéril.

Posteriormente se trituraron en una solución salina con la ayuda de un mortero. La solución salina contiene por litro: 0.1 g de fosfato dipotásico, 0.05 g de sulfato de magnesio, 0.02 g de cloruro de sodio, 0.05 g de cloruro de calcio dihidratado. Se dejaron reposando en la solución aproximadamente 15 minutos y a partir de una dilución se inoculó en los medios selectivos.

2.3. Inoculación en medios

2.3.1. Preparación de medios

Las muestras del 2019 se inocularon en tres medios selectivos: TY (*Tryptone yeast*) adicionado con calcio, AGS para actinobacterias y King B para *Pseudomonas fluorescences*.

El medio TY contiene por litro: 6 g de triptona, 3 g de extracto de levadura, 0.38 g de cloruro de calcio y 15 g de agar. Para el medio AGS se requiere por litro: 1 g de arginina mono clorhidrato, 12.5 g de glicerol, 1 g de fosfato dipotásico, 1 g de cloruro de sodio, 0.5 g de sulfato de magnesio heptahidratado, 0.01 g de sulfato de hierro hexahidratado, 0.001 g de sulfato de cobre pentahidratado, 0.001 g de sulfato de zinc heptahidratado, 0.001 g de sulfato de magnesio y 15 g de agar, el pH se ajustó de 6.9 a 7.1. El medio King B requiere para su preparación por litro: 20 g de peptona, 1.5 g de fosfato dipotásico anhídrido, 1.5 g de sulfato de magnesio heptahidratado y 12 g de agar. Estos medios se vaciaron en cajas Petri de 10 cm, aproximadamente 20 ml por caja.

De los muestreos del 2020 se aislaron bacterias diazótrofes a partir de los medios selectivos NFb, LGI y Azotobacter. El medio NFb semisólido propuesto por Baldani et al. (2014), requiere para su preparación por litro: 5 g de ácido málico, 0.5 g de fosfato dipotásico, 0.2 g de sulfato de magnesio heptahidratado, 0.1 g de cloruro de sodio, 0.2 g de cloruro de calcio dihidratado, 4.5 g de hidróxido de potasio, 2 ml de solución de micronutrientes de micronutrientes (Sol. -1000 mL: 0.04 g de sulfato de cobre (II) pentahidratado, 0.12 g sulfato de zinc heptahidratado, 1.4 g ácido bórico, 1.17 g de molibdato de sodio dihidratado), 2 ml de azul de bromotimol, 4 ml FeEDTA (1.64 1%), 1 ml de biotina y 1.8 g de agar. Además, se preparó una variación del medio NFb con 1.2 g/l de cloruro de sodio y se le etiquetó como medio NFb1.2. El pH se ajustó a 6.5 en ambos casos.

El medio LGI propuesto por Baldani et al. (1984), requiere para su preparación por litro: 5 g de sucrosa, 0.2 g de fosfato dipotásico, 0.6 g de fosfato mono potásico, 0.2 g de sulfato de magnesio heptahidratado, 0.002 g de cloruro de calcio dihidratado, 5 ml de azul de bromotimol, 4 ml FeEDTA (Hierro), 1 ml de biotina, 1.8 g de agar y el pH se ajustó a 6.2. El medio Azotobacter requiere para su preparación por cada litro: 5 g de glucosa, 5 g de manitol, 0.10 g de cloruro de calcio dihidratado, 0.005 g de molibdato de sodio, 0.90 g de fosfato dipotásico, 0.1 g de fosfato mono potásico, 0.01 g de sulfato de hierro heptahidratado, 5 g de carbonato de calcio, 1.5 g de agar y el pH se ajusta a 7.3. La glucosa y el manitol se prepararon por separado en 50 ml de agua destilada. Se colocaron 5 ml de medio en viales de 12 ml y se esterizaron a 15 lb de presión y 120°C durante 15 minutos. En el caso del medio Azotobacter el medio se agregó en los viales después de la esterilización, tras haber mezclado el manitol y la glucosa posterior a la esterilización.

2.3.2. Inoculación y aislamiento en medios sólidos y semisólidos

Se tomaron 100 µL de la solución obtenida y se diluyó en 900 µL de solución salina (dilución 10: 100), se tomaron 100 µL de la dilución anterior y se diluyeron nuevamente en 900 µL de solución salina (dilución 10: 1000). De la dilución 10:1000 se tomaron 50 µL y se inocularon en las cajas con medios solidos o en los viales con medios selectivos para diazótrofes.

Los viales se revisaron cada tercer día observando si había crecimiento bacteriano en la interfase, entre el medio y el aire. En aquellos viales donde se observaron crecimientos bacterianos en un periodo de 7 a 10 días se re-inocularon en medio semisólido, después en cajas Petri con medio sólido, agregando

15 gramos por litro de agar, y posteriormente en medio sólido TY. De igual manera las colonias que se observaron en las cajas con los distintos medios sólidos se pasaron a medio TY para obtener colonias aisladas y se resguardaron hasta el momento de la caracterización.

2.4. Caracterización de los aislados como promotores de crecimiento y antagonistas

Los aislados fueron sometidos inicialmente a una serie de pruebas para determinar si poseían propiedades de promoción de crecimiento vegetal. Se evaluó la solubilización de distintos nutrientes mediante pruebas colorimétricas, la cuantificación del AIA, la producción de biofilm y la evaluación de su actividad antagónica. Para la evaluación de solubilización de nutrientes se preparó un cultivo por aislado de 3 ml en medio líquido TY en tubos de vidrio de 10 ml a partir de gliceroles, dejándolo en incubación por 24 horas a 30°C. Se finalizó con pruebas de resistencia al estrés hídrico y salinidad con un grupo de aislados seleccionados de acuerdo a los resultados del primer grupo de pruebas.

2.4.1. Prueba de solubilización de zinc

El zinc es un micronutriente involucrado en la fotosíntesis y en el metabolismo de los carbohidratos, la principal función de este es estabilizar y/ o activar las proteínas involucradas en estos procesos (Amezcu y Lara, 2016).

Para esta prueba se utilizó el medio Pikovskaya suplementado con óxido de zinc (Komal & Kalavati, 2018; Tagele et al., 2019). Se preparó a partir de 1 g de glucosa, 0.05 g de extracto de levadura, 0.05 g de sulfato de amonio, 0.02 g de cloruro de potasio, 0.01g de sulfato de magnesio heptahidratado, 0.00001g de sulfato de manganeso, 0.00001 g de sulfato de hierro, 1.2 g de óxido de zinc y 0.25 g azul de bromotimol (0.025%). Antes de aforar a un litro se ajustó el pH a 7 y posteriormente el medio fue esterilizado a 120° C y 15 Lb de presión por 15 minutos. Se colocaron aproximadamente 10 ml de medio en cajas Petri de 6 cm y se inocularon 25 µl de cada cultivo por aislado. Se incubaron durante 48 horas a 30° C y el cambio en el medio de azul a amarillo indicaría resultado positivo.

2.4.2. Prueba de solubilización de potasio

El potasio juega un papel importante en la absorción del dióxido de carbono en las plantas. Regula la apertura y cierre de las estomas durante la fotosíntesis y es esencial para la producción de ATP (Restrepo-Correa et al., 2017).

Para evaluar la capacidad de solubilización de potasio de los aislados bacterianos se empleó el medio Pikovskaya modificado (Velázquez-Gurrola y Ramos-Alegría, 2015). Se requiere por litro: 0.5 g de extracto de levadura, 10 g de glucosa, 0.5 g de nitrato de potasio, 0.5 g de sulfato de amonio, 0.2 g de cloruro de potasio, 0.1 g de sulfato de magnesio, 0.0001 g de sulfato de manganeso, 0.0001 g de sulfato de hierro, 0.002 g de azul de bromocresol. Estos reactivos se disolvieron en 500 mL de agua destilada, una vez ajustado el pH a 7.2 se agregaron 15 g de agar, se aforó el medio a 1 L y se esterilizó a 15 lb de presión y 120°C durante 15 minutos. Se colocaron aproximadamente 10 ml de medio en cajas Petri de 6 cm y se inocularon 25 µl de cada aislado. Después de realizar la inoculación, las placas se incubaron durante 72 horas a 30°C. El cambio de coloración en el medio de color azul a amarillo indicó resultado positivo en la solubilización de potasio.

2.4.3. Prueba de solubilización de fosforo

El fosfato se produce por la oxidación y la reducción de compuestos del fosforo mediante reacciones de transferencia de electrones (McDonald et al., 2001). El mecanismo principal para su solubilización es la producción de ácido glucónico, y enzimas como fitasas, C-P liasa y fosfatasas (Otieno et al., 2015). En las plantas acelera la maduración, promueve la producción de semillas y es importante en numerosos procesos metabólicos como la biosíntesis de glúcidos y lípidos, y la síntesis de clorofila y carotenoides (Estrada et al., 2011).

Se empleó el medio Pikovskaya suplementado con púrpura de bromocresol (Pikovskaya, 1948; Corrales-Ramírez et al., 2014). En la preparación del medio se emplearon por litro: 0.5 g de extracto de levadura, 10 g de glucosa, 5 g de fosfato de calcio, 0.5 g de sulfato de amonio, 0.2 g de cloruro de potasio, 0.1 g de sulfato de magnesio, 0.0001 g de sulfato de manganeso, 0.0001 g de sulfato de hierro, 0.01 g púrpura de bromocresol. Estos reactivos fueron disueltos en 500 mL de agua destilada y una vez ajustado el pH de la solución a 7.2 se agregaron 15 g de agar, después se aforó el medio a 1 litro y se esterilizó a 15 lb de presión y 120°C durante 15 minutos. Se colocaron aproximadamente 10 ml de medio en cajas Petri

de 6 cm y se inocularon 25 µl de cada aislado. Las cajas se incubaron durante 48 horas a 30°C. El cambio de coloración en el medio de color morado a amarillo indicó resultado positivo en la solubilización del fosfato.

2.4.4. Evaluación cualitativa in vitro de la actividad antagónica de los aislados sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* raza 1

Este ensayo se realizó en cajas Petri de 10 cm con medio sólido PDA. Se utilizaron colonias bacterianas crecidas en medio sólido TY. Se colocó un disco del micelio del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* raza 1 y por cada placa se evaluaron tres aislados bacterianos, los cuales se inocularon a los extremos de la placa con un asa bacteriológica. Como control se inoculó solo el hongo en una placa y se realizó sólo una repetición para cada aislado. Las placas se incubaron durante cinco días a 25°C. La formación de un halo de inhibición o la reducción del crecimiento del hongo por invasión del crecimiento bacteriano indicó resultado positivo en la capacidad antagónica del aislado bacteriano.

2.4.5. Evaluación cuantitativa in vitro de la actividad antagónica de los aislados ante *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* raza 1

Para cuantificar la actividad antagónica se seleccionaron aquellos que mostraron antagonismo en la prueba cualitativa. La evaluación se realizó por medio de ensayos duales de acuerdo con la metodología propuesta por Jeyaseelan et al., (2012). Consistió en colocar un disco del micelio del hongo en un extremo de una caja Petri con medio PDA Difco™ y del otro extremo un aislado bacteriano. Se realizaron tres replicas técnicas por aislado, como control se inoculó el hongo en el extremo de la caja sin aislado bacteriano. En el caso de las bacterias que mostraban morfologías características de *Bacillus* nadadores se le otorgó un día de ventaja al hongo. Las placas se incubaron 10 días a 30° C, tiempo en el que las cajas control se cubrieron del micelio del hongo. Posteriormente se calculó el porcentaje de inhibición de los aislados usando la fórmula reportada por Jeyaseelan et al., (2012):

$$\% \text{ Porcentaje de inhibición} = \frac{R - r}{R} * 100$$

donde R es el radio del crecimiento del hongo del control y r corresponde al radio del crecimiento del hongo en presencia de la bacteria.

2.4.6. Cuantificación de producción del Ácido indol acético (AIA)

Cada cepa se inoculó directo de gliceroles en 3 ml de medio líquido TY suplementado con 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de triptófano (Ahmad et al., 2008) en tubos de vidrio de 10 ml, usando tres replicas técnicas por aislado. El cultivo se mantuvo en agitación constante durante 48 horas a una temperatura de 30°C y 150 rpm. Posteriormente, se pasó el cultivo a tubos Eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó a 10,000 rpm durante 3 minutos. Del sobrenadante se colocaron 200 μL en una microplaca de 96 cavidades y se adicionaron 100 μL del reactivo Salvkowsky por pozo (Gordon & Weber, 1951). Para el desarrollo de la curva de calibración las concentraciones de AIA fueron ajustadas a 5, 10, 20, 50, y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se dejaron reposar por un periodo de 15 minutos y se midió la densidad óptica 540 nm un lector de placas Multiskan Sky de ThermoFisher y el software Thermo Scientific Skanlt PC, el cual determina las concentraciones de AIA a partir de la curva patrón mediante un modelo de regresión lineal, contemplando la desviación estándar y el coeficiente de variación para las réplicas técnicas realizadas.

2.4.7. Cuantificación de la producción de biofilm

Esta evaluación se realizó siguiendo la metodología modificada propuesta por O'Toole (2011). Cada cepa se inoculó por triplicado en 200 μL de medio líquido TY en una microplaca de 96 cavidades. Los cultivos se dejaron en incubación por 24 horas a una temperatura de 30°C y 150 rpm. Después se colocaron sobre una mesa por 24 horas. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo volteando la placa sobre una charola y se pasó a otra charola para ser enjuagada. Se dejó reposar por 5 minutos hacia abajo para retirar el exceso de agua y después se agregaron 200 μL de cristal violeta al 0.1% y se dejó reposar 15 minutos a fin de permitir que el colorante se uniera al biofilm. Transcurrido el tiempo se retiró el colorante volteando la caja sobre una charola con agua y se enjuagó la placa tres veces con agua de la llave. La placa se dejó secando 30 minutos volteada con un ángulo aproximado de 30 grados. Una vez que no había residuos de agua se agregaron 250 μL de ácido acético al 30% con el fin de disolver el colorante que había quedado unido al biofilm y después de 15 minutos se pasaron 200 μL a una microplaca limpia. Se colocó como blanco

el ácido acético y la absorbancia se midió a 550 nm en el lector de placas Multiskan Sky de ThermoFisher con el software Thermo Scientific Skanlt.

2.4.8. Evaluación de la respuesta ante el estrés hídrico (estrés osmótico)

Esta prueba se realizó con los aislados que mostraron mayor potencial como promotoras de crecimiento en las pruebas de caracterización anteriores, a partir de la metodología propuesta por Wang et al., (2014). Primeramente, se inocularon los aislados bacterianos desde glicerol en tubos de vidrio estériles de 10 ml con 2 ml de medio nutritivo TY y se dejaron incubando en agitación por 24 horas a una temperatura de 30°C y 150 rpm. Posteriormente, las bacterias fueron inoculadas por triplicado a un valor de absorbancia aproximado de .03 (D.O. 600 nm) en tubos de vidrio de 10 ml con medio nutritivo TY adicionado con polietilenglicol 6000 (PEG) a una concentración de 10%, 20% y 30%; como control se utilizó medio TY. Adicionalmente se agregó triptófano (500 µg/mL) a todos los medios, con el fin de evaluar si en estas condiciones había diferencias en la producción del ácido indol acético. Se midió la densidad óptica a 600 nm para registrar la absorbancia en el tiempo cero y se dejaron incubando en agitación durante 72 horas a una temperatura de 30°C y 150 rpm, midiendo la absorbancia cada 24 horas. Al finalizar se midió la producción del AIA contrastando con la curva de calibración antes mencionada en la sección 2.4.6 (Aniruddha y Jubair, 2013); la producción se ajustó de acuerdo a la absorbancia observada a las 72 horas. Las lecturas se tomaron en el lector de placas Multiskan Sky de ThermoFisher y el software Thermo Scientific Skanlt.

2.4.9. Evaluación de la respuesta a estrés por salinidad

Al igual que en la prueba anterior sólo se utilizaron los aislados con mayor potencial como PGPR. A partir de un cultivo *overnight* los aislados se inocularon por triplicado a un valor de absorbancia aproximado de .03 (D.O. 600nm) en tubos con medio nutritivo TY adicionado con cloruro de sodio (NaCl) .5%, 1% y 3% (López- Alcocer et al., 2017); como control solo medio TY. Adicionalmente, se agregó triptófano (500 µg/mL) a todos los medios, con el fin de evaluar si en estas condiciones había diferencias en la producción del ácido indol acético. Se midió la densidad óptica a 600 nm y se dejaron incubando en agitación constante durante 72 horas a una temperatura de 30°C y 150 rpm, registrando la absorbancia cada 24 horas. Al finalizar se midió la producción del ácido indol acético, y se ajustó conforme a la absorbancia del cultivo

reportada a las 72 horas. Las lecturas se tomaron en el lector de placas Multiskan Sky de ThermoFisher y el software Thermo Scientific SkanIt PC.

2.5. Identificación molecular mediante la secuenciación del gen RNAr 16s

La identificación de las cepas se realizó a través de la secuenciación del gen RNAr 16s. Se purificó el ADN genómico de los aislados usando el kit Genra Puregen de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para los aislados donde no se logró la extracción con el kit anterior se utilizó el kit Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit de ZYMO research, siguiendo las instrucciones del fabricante. El gen se amplificó por PCR usando los primers 27F (5'- AGAGTTTGA TCMTGGCTCAG-3') (Lane, 1991) y 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Turner et al., 1999). Cada reacción se llevó a cabo en un volumen total de 50 μ L, conteniendo 1 μ L de DNA genómico (~10 ng), 10 μ L de Taq Buffer10 X, 0.5 μ L de dNTP mix (0.2 μ M), 1 μ L del Primer 27F (0.4 μ M), 1 μ L del Primer 1492R (0.4 μ M), 0.5 μ L de Taq DNA polimerasa (1.25 U/ μ L) (Thermo Fisher) y 37 μ L de agua destilada. Para la amplificación se utilizó un termociclador MiniAmp Plus Thermal Cycler, bajo las siguientes condiciones: un paso de desnaturalización inicial de 95°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 48°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto y un ciclo final 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR se verificaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% usando como referencia una escalera de 1 kb.

Los productos que mostraron el tamaño aproximado de 1500 nucleótidos fueron purificados usando el protocolo de QIAquick PCR Purification (QIAGEN), utilizando los buffers preparados de manera casera. Para la purificación se agregaron 5 volúmenes de Buffer PB (100ml: 5M Gu- HCL hidroclorido de guanidina, 30% isopropanol) a un volumen de reacción de PCR. Posteriormente se pasó a una columna Qiaquick con un tubo de colecta de 2 ml y se centrifugó por un minuto, se descartó el fluido y se agregaron 750 μ L de buffer PE (100ml: 10mM Tris- HCL pH 7.5, 80% etanol) a la columna y se centrifugó un minuto a 12,000 Rpm; se descartó el fluido y se centrifugó nuevamente. Para eluir el ADN, la columna se colocó en un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 ml y se agregaron 50 μ L de buffer EB (100 ml: 10mM Tris-HCl pH 8.5) y se centrifugó 1 minuto. Los productos purificados se secuenciaron por el método de Sanger (Sanger et al., 1965) en Eton Bioscience, Inc. Las secuencias obtenidas fueron comparadas mediante un Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) con la base de datos de nucleótidos de GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

2.6. Detección del gen *nifH* en aislados obtenidos a partir de medios selectivos para diazótrofos

Con el fin de confirmar la fijación de nitrógeno de las bacterias aisladas a partir de medios libres de nitrógeno se realizó una PCR para la búsqueda del gen *nifH*, uno de los genes más conservados en bacterias diazótrofes. En el primer ensayo se utilizaron los *primers* lueda19F (GCIWYTYAYGGIAARGGIGG) (Ueda et al., 1995), F2 (TGYGAYCCIAAIGCIGA) y R6 (TCIGGIGARATGATGGC) (Marusina et al., 2001), elegidos a partir de antecedentes de eficiencias reportados en los trabajos de Gaby y Buckley (2012) y Angel et al., (2018). Primero se realizó una PCR con los *primers* lueda19F y R6, y después se combinó R6 con F2. Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 μ L, que contenía: 1 μ L de DNA genómico (~10 ng), 5 μ L de Taq Buffer 10 X, 0.25 μ L de dNTP mix (0.2 μ M), 0.5 μ L del Primer Ueda19F y 0.5 μ L del Primer 19F (0.4 μ M), 0.25 μ L de Taq DNA polimerasa (1.25 U/ μ L) (Thermo Fisher) y 17.5 μ L de agua destilada. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador MiniAmp Plus Thermal Cyler, bajo las siguientes condiciones: un paso de desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 45 segundos, 72°C por 30 minutos y un paso sencillo de elongación final. Los productos de PCR se verificaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% esperando observar un tamaño aproximado de 450 pares de bases.

Se realizó un segundo ensayo a partir de la metodología de *nested primers* reportada por Montañez et al., (2017). Para la primera amplificación se emplearon los *primers* 19F (5-GCIWYTYAYGGIAARGGIGG) (Ueda et al., 1995) y *nifH3* (5-ATRTTRTTNGCNGCRTA) (Zani et al., 2000), la amplificación se llevó a cabo en un volumen de 25 μ L, contenía: 1 μ L de DNA genómico (~10 ng), 5 μ L de Taq Buffer 10 X, 0.25 μ L de dNTP mix (0.2 μ M), .5 μ L del *Primer nifH3* y .5 μ L del *Primer 19F* (0.4 μ M), 0.25 μ L de Taq DNA polimerasa (1.25 U/ μ L) (Thermo Fisher) y 17.5 μ L de agua destilada. El ciclo de amplificación tenía las siguientes condiciones: un paso de desnaturalización inicial de 95°C, seguido de 20 ciclos a 48°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, 94°C por 45 segundos, y un paso final de elongación a 72°C antes de terminar la reacción a 4°C. Para la segunda PCR se utilizaron los *primers* *nifH11* (5-GAYCCNAARGCNGACTC) y *nifH22* (5-ADWGCCATCATYTCRCC) (Yeager et al., 2004). También se realizó en un volumen de 25 μ L utilizando 2 μ L de la primera reacción en lugar del templado. La amplificación se llevó bajo las mismas condiciones, excepto que la temperatura de anillamiento se incrementó a 55°C y el número de ciclos a 35. Las muestras se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5% teniendo como positivos aquellas muestras que presentaran un tamaño aproximado de 450 pares de bases. En las reacciones donde se observaron distintos tamaños de banda dentro del mismo aislado se procedió a realizar cortes del gel, las muestras se colocaron en tubos Eppendorf de 1 ml y se realizó la purificación de la banda del gel.

La purificación del gel consistió en pesar cada tubo y agregar 3 volúmenes de Buffer QG (5.5 M tiocianato de guanidina, 20 mM Tris HCl pH 6.6) a un volumen de gel, después se incubaron por 15 minutos a 50°C para disolver el gel. Se agregó un volumen de isopropanol por volumen de gel y se pasó la muestra a una columna de centrifugado con un tubo de colecta de 2 ml. Se centrifugó a 13000 rpm y se desechó el flujo del tubo de colecta. Para lavar se agregó 0.75 ml de tampón PE en la columna y se centrifugo por 1 minuto, se desechó el flujo y se centrifugó por 1 minuto a 13000 rpm. Para eluir el ADN se colocó una columna en un tubo de microcentrífuga limpio, y se agregaron 50 microlitros del buffer EB y se centrifugó por 1 minuto.

2.7. Evaluación de los aislados sobre la germinación en semillas de Solanáceas: tomate (*S. lycopersicum* variedad *Bonnie best*), chile serrano (*C. annuum*) y berenjena (*S. melongena*)

Para este ensayo se emplearon semillas de tomate de la variedad *Bonnie best*, de chile serrano y de berenjena. Se siguió la metodología propuesta por Xu et al., (2014). Las semillas fueron esterilizadas superficialmente realizando un enjuague con etanol al 70% por 3 minutos, otro enjuague con hipoclorito de sodio al 2.5% por 3 minutos, finalizando con 4 enjuagues de agua destilada estéril.

Los aislados bacterianos que habían estado en incubación por 24 horas a una temperatura de 30°C y 150 rpm en 5 ml de cultivo líquido TY se ajustaron a una concentración de 1×10^7 UFC en solución salina (NaCl 0.85%) aforando a 3 ml el volumen total. Se sumergió un aproximado de 30 semillas por aislado en el cultivo por 60 minutos. Como control positivo se empleó una cepa de *Bacillus subtilis* aislada a partir del producto comercial BACTISHOCK®, de la empresa Bioproductora de Jardines Sostenibles S.C. de R. L. de C.V. Como control se simuló la inoculación solo con solución salina.

Posteriormente, se colocaron ocho semillas en cajas Petri con agar agua al 0.8%, usando tres replicas técnicas por aislado. Las placas se envolvieron en papel aluminio, aleatorizando el orden, dividiendo las cajas totales en tres paquetes. Se dejaron incubando de manera vertical a 25°C por un periodo de: 5 días posterior a la germinación en el caso del tomate, y 7 días para las semillas de berenjena y chile. Se contabilizó el total de semillas germinadas cada 24 horas por tratamiento y al finalizar se midió el tamaño de las radículas e hipocótilo con una regla. Con los datos obtenidos se llevó a cabo un análisis ANOVA mediante una comparación múltiple de medias con la prueba Tukey en el programa JASP 0. 11.1

(<https://jasp-stats.org/>) con el fin de observar diferencias significativas entre los tratamientos por especie vegetal al comparar con el tratamiento control (simulación).

2.8. Evaluación del efecto de los aislados en solanáceas de interés agrícola mediante ensayos de invernadero

2.8.1. Germinación de semillas

A partir de los resultados obtenidos en las pruebas de germinación *in vitro* se seleccionaron cuatro aislados que mostraron consistencia para realizar ensayos en invernadero: EBCAb1, EBCAb9, EBCAf6 y EBCAe10. Se usaron distintas semillas de solanáceas para evaluar si había diferencias entre los tratamientos por especie de planta comparando con el control. Se emplearon semillas de tomate, berenjena y chile, y como control externo a las solanáceas se utilizaron semillas de rábano (*Raphanus sativus* L.).

Se esterilizaron de superficialmente 350 semillas para cada planta, siguiendo el protocolo descrito en la sección anterior. Se colocaron de 2 a 3 semillas por cavidad en charolas de germinación de 50 pocillos que contenía sustrato de esfagno (Cosmo Peat®) con máxima hidratación. Las charolas se cubrieron con plástico negro para estimular la germinación de las semillas y se mantuvieron en un cuarto con iluminación constante. Cuando se observó germinación en las primeras semillas se retiró la bolsa y las charolas se colocaron en una mesa en el invernadero de fitopatóloga del CICESE. Posteriormente, se irrigaron las plántulas diariamente manteniendo la humedad adecuada del sustrato hasta que se observó la aparición de hojas verdaderas.

2.8.2. Preparación del inóculo e inoculación de plántulas

A partir de gliceroles se preparó un cultivo *overnight* para cada aislado seleccionado en 50 ml de medio TY. Además, como control positivo se utilizaron dos aislados provenientes del suelo de la rizosfera de *S. hindisianum* del género *Pseudomonas* sp. del trabajo de Delgado- Ramírez (2020), los cuales mostraron tener efectos positivos en la promoción de crecimiento en plantas de tomate mediante experimentos *in vivo* de invernadero. El cultivo *overnight* se ajustó a una concentración de 1×10^6 UFC en un volumen de 100 ml con solución salina (NaCl .85%), basándose en una densidad óptica optimizada para cada cepa.

Las plántulas se trasplantaron en macetas de 6 pulgadas que contenían sustrato de esfagno con máxima hidratación y se inoculó el suelo con 1 ml del inóculo por plántula. Como control se simuló la inoculación con solución salina. Se realizaron 10 réplicas por cada tratamiento por especie de planta, terminando con un total de 70 plantas por tratamiento. El lugar de cada maceta en la mesa se aleatorizó con la función <<ALEATORIO>> en una hoja de Excel.

El primer riego se realizó a las 48 horas post inoculación con el fin de ayudar a la planta a absorber el máximo inóculo posible. Posteriormente se regaron las plantas dependiendo de la hidratación requerida del sustrato. A los 15 días siguientes se realizó una segunda inoculación de la misma manera, optimizando la concentración para cada colonia a 1×10^6 UFC y 1 ml por planta. Las plantas se mantuvieron creciendo en el invernadero según el crecimiento observado para cada especie: el rábano por 28 días, el tomate y la berenjena 35 días y el chile 42 días.

2.8.3. Procesamiento de muestras y análisis estadístico

Al finalizar el tiempo en el invernadero a cada planta se le enjuagaron las raíces con abundante agua de la llave con el fin de retirar la mayor parte del suelo sin dañar las raíces y los pelos radiculares. Para medir el área foliar se utilizó la aplicación en teléfono móvil *Easy Leaf Area* (<https://www.quantitative-plant.org/>). Se tomaron medidas del largo del tallo y de las raíces, así como del diámetro del tallo a la altura de la corona, con el programa de procesamiento de imágenes digitales ImageJ (<https://imagej.nih.gov/>).

Posteriormente, cada planta se colocó en una bolsa de plástico con cierre hermético y se mantuvieron en un cuarto frío a 4°C hasta su secado para obtener el peso seco. Para el secado de las plantas se colocó la raíz, el tallo y las hojas de cada planta en hojas de papel *Kraft* y se acomodaron de manera vertical en un horno de secado a 70°C de 72 a 96 horas. Al finalizar se pesó en una balanza cada tejido por separado (hojas, tallos y raíces). En una hoja de Excel se calculó el largo específico de las raíces (RSL), dividiendo el largo sobre el peso seco de las mismas. También se estimó la masa foliar por área (LMA), dividiendo el peso seco de las hojas sobre el área foliar.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa JASP 0.11.1. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una comparación múltiple de medias mediante la prueba POST HOC de Tukey ($p \leq 0.05$). Los tratamientos fueron significativos donde el valor de $p \leq 0.05$ al comparar cada tratamiento bacteriano

individualmente ante el control. Se graficaron los parámetros que fueron estadísticamente significativos en al menos una especie vegetal.

Capítulo 3. Resultados

3.1. Aislamiento de bacterias endófitas de *Solanum hindsianum*

Se logró obtener 31 aislados bacterianos: 8 fueron recuperados de los medios selectivos para fijadoras de nitrógeno y 23 del medio AGS, King B, y TY (tabla 2). Los aislados EBCAb1 al EBCAc1 se presentan como diazótrofos putativos al ser aislados de los medios selectivos, provenientes de los muestreos del 2020.

Tabla 2. Aislados bacterianos obtenidos de los sitios de colecta.

Aislado	Sitio
EBCAb1	S20
EBCAb2	S20
EBCAb6	S21
EBCAb7	S21
EBCAb8	S21
EBCAb9	S21
EBCAb10	S21
EBCAc1	S21
EBCAe1	S1
EBCAe2	S1
EBCAe3	S1
EBCAe4	S1
EBCAe5	S2
EBCAe6	S2
EBCAe7	S2
EBCAe8	S3
EBCAe9	S4
EBCAe10	S4
EBCAf1	S4
EBCAf2	S13
EBCAf3	S13
EBCAf4	S12
EBCAf5	S14
EBCAf6	S14
EBCAf7	S14
EBCAf8	S15
EBCAf9	S15
EBCAf10	S16
EBCAg1	S16
EBCAg2	S15
EBCAg3	S15

Se muestra el nombre del aislado y el sitio de colecta.

3.2. Evaluación in vitro de las características de promoción de crecimiento vegetal de los aislados

Mediante las pruebas de solubilización de nutrientes se encontró 25 aislados capaces de solubilizar fósforo, 27 potasio, y no se detectó la solubilización del zinc (Figura 1, Tabla 3). En cuanto a la producción de AIA se detectó la producción en 27 aislados; EBCAb6 y EBCAe10 mostraron los niveles máximos, alcanzando 35.87 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 34.82 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente.

Tabla 3. Resultados de las pruebas colorimétricas, cuantificación de AIA y biofilm, y actividad antagonista.

Aislado	Solubilización de zinc	Solubilización de fósforo	Solubilización de potasio	AIA ($\mu\text{g}/\text{ml}$) D.O. 550 nm	Biofilm D.O. 540 nm	Porcentaje de actividad antagonista contra <i>FOLR1</i>
EBCAb1	-	+	+++	29.31	0.370	3.51
EBCAb2	-	+	+++	35.87	0.279	4.52
EBCAb6	-	-	+++	ND	0.147	11.87
EBCAb7	-	+	+	ND	2.123	-
EBCAb8	-	-	+	ND	1.669	-
EBCAb9	-	+	++	26.11	1.436	17.73
EBCAb10	-	+	++	31.05	0.634	15.52
EBCAc1	-	+	++	6.55	2.857	12.17
EBCAe1	-	+	+	7.24	3.949	11.20
EBCAe2	-	+	+	8.34	1.027	-
EBCAe3	-	-	-	7.28	1.761	-
EBCAe4	-	+	+	5.99	2.904	-
EBCAe5	-	+	+	6.33	0.517	-
EBCAe6	-	+	+	5.29	0.246	13.21
EBCAe7	-	+	+	5.57	0.229	4.18
EBCAe8	-	-	+	18.05	0.298	-
EBCAe9	-	+	+	14.22	1.721	7.69
EBCAe10	-	+	+	34.82	1.576	-
EBCAf1	-	+	+	11.17	0.627	-
EBCAf2	-	+	+	8.94	0.638	-
EBCAf3	-	+	+	18.22	0.410	-
EBCAf4	-	-	-	8.22	0.230	-
EBCAf5	-	-	-	6.20	0.326	10.03
EBCAf6	-	+	-	10.55	4	22.74
EBCAf7	-	+	+	28.97	0.384	12.37
EBCAf8	-	+	+	7.63	0.106	-
EBCAf9	-	+	+	7.95	0.327	-
EBCAf10	-	+	+	26.41	0.664	14.38
EBCAg1	-	+	+	6.37	0.539	6.19
EBCAg2	-	+	+	ND	0.366	11.96
EBCAg3	-	+	+	8.10	0.065	-

(+): positivo; (++): positivo con una alta capacidad de solubilización; (-): negativo para la prueba; (ND): no se detectó la producción.

Referente a la producción de biofilm, se detectó absorbancia en todos los aislados comparando con el blanco. Resaltan los aislados EBCAe1, EBCAf3 y EBCAf6 con un valor de absorbancia cercano al máximo (4). Las tres cepas tienen características morfológicas que sugieren pertenecen al género *Bacillus* sp.

En los ensayos cualitativos de antagonismo 16 dieron positivo ante *F. oxysporum*. A estos se les cuantificó su actividad mediante los ensayos duales y se encontraron porcentajes de inhibición desde 3.51 hasta un 22.7%. Destacan los aislados EBCAf6, EBCAb9 y EBCAb10 con 22.74, 17.73 y 15.52% respectivamente (Figura 6).

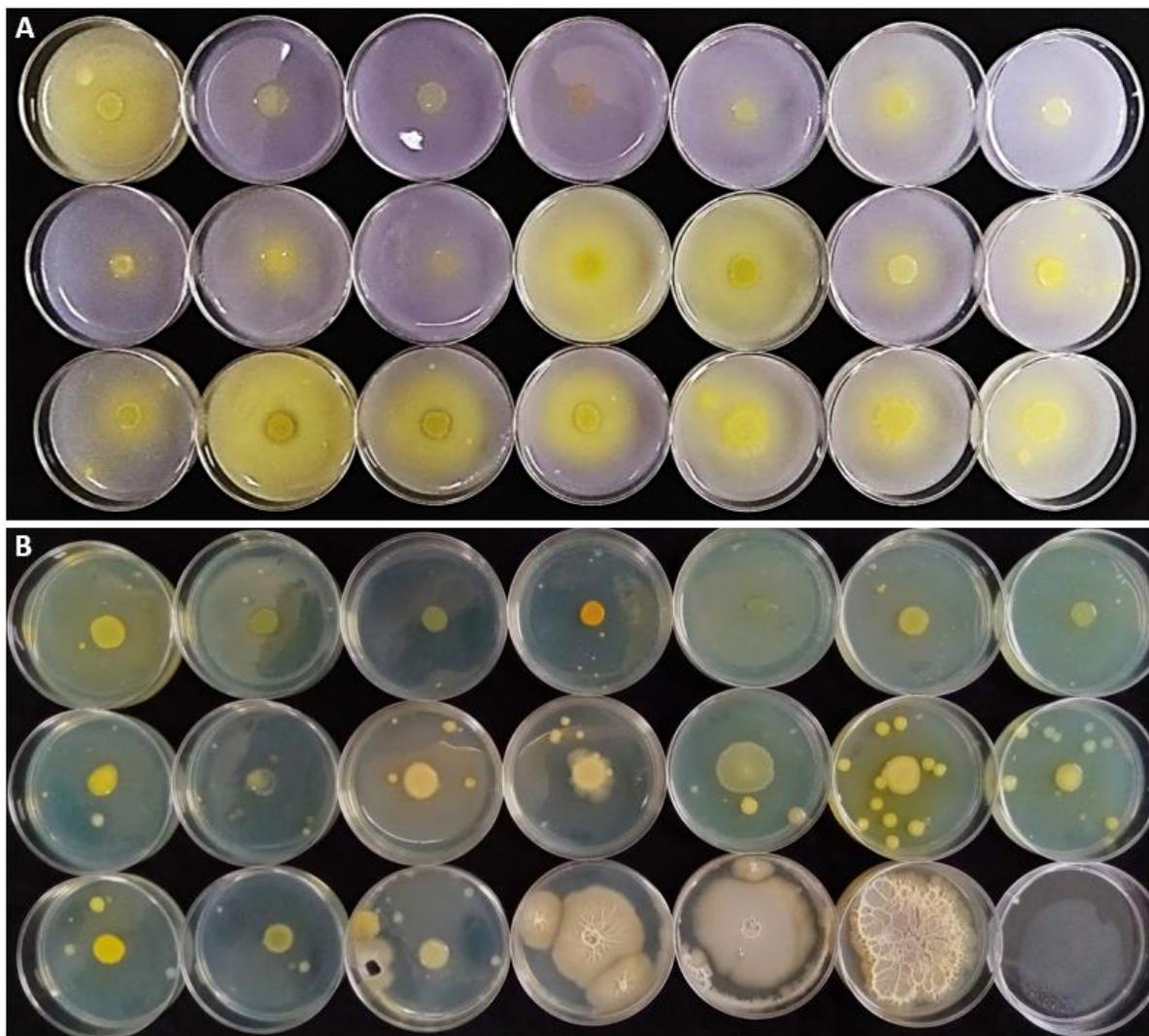


Figura 1. Ejemplos de los resultados obtenidos de las pruebas colorimétricas de solubilización de nutrientes. (A): fósforo; (B): Potasio.

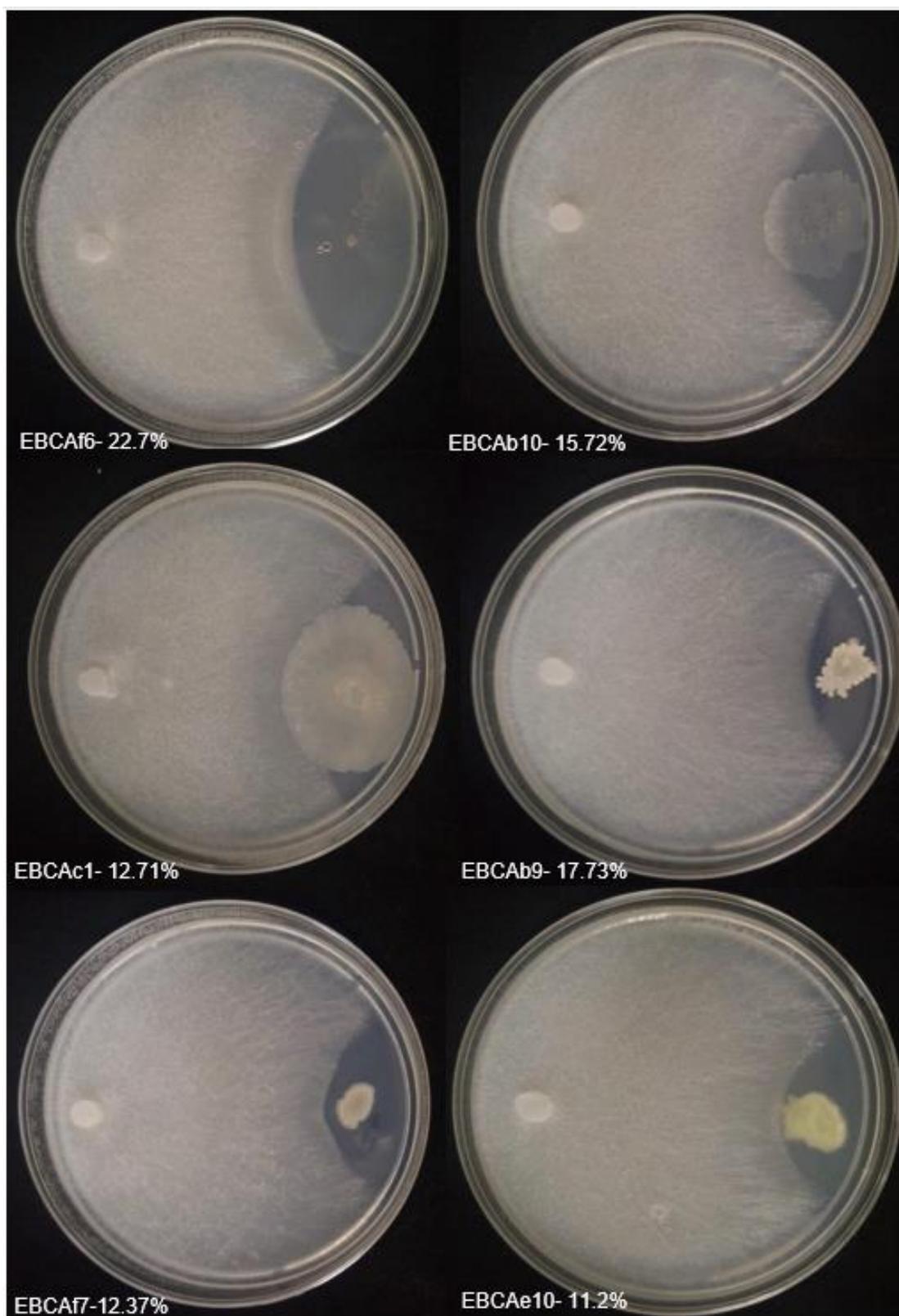


Figura 2. Ejemplos de los ensayos de antagonismo mediante ensayos duales. Se muestra la clave del aislado y el porcentaje de inhibición.

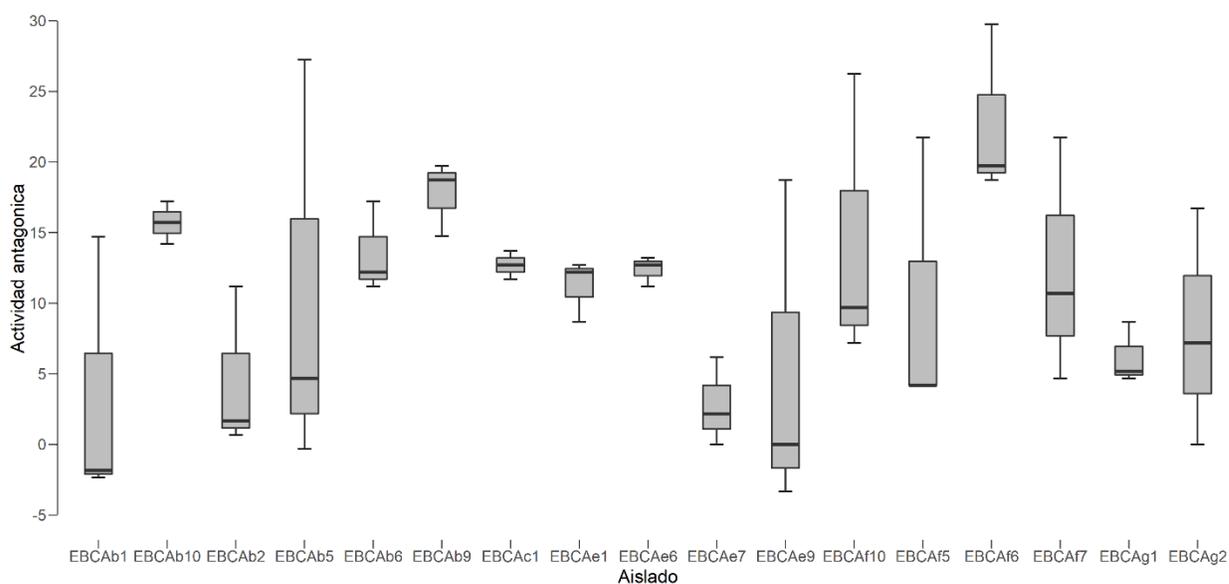


Figura 3. Resultados de los ensayos duales en la evaluación de antagonismo. El eje Y indica el porcentaje de inhibición de acuerdo a la fórmula reportada por Jeyaseelan et al., (2012).

3.3. Evaluación de la tolerancia al estrés hídrico (estrés osmótico)

Esta prueba se realizó con los aislados que mostraron mayor potencial como promotores de crecimiento vegetal mediante las pruebas de caracterización *in vitro*: EBCAb1, EBCAb2, EBCAb9, EBCAb10, EBCAe10, EBCAf3, EBCAf6, EBCAf7 y EBCAf10. En general se observó un pequeño retraso en el crecimiento de los aislados en comparación con el control. Aun así, se mantiene el crecimiento a diferente nivel en los aislados incubados con PEG (Figura 4).

En cuanto a la cuantificación de AIA, en los aislados EBCAb9 y EBCAb10 no se detectó la producción en el tratamiento control, solo a una concentración de PEG del 10%, 1.77 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 2.92 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente y nula para el 20% y 30%. En casos como EBCAf6 y EBCAf7, no se detectó la producción en ningún tratamiento. El caso más sobresaliente es el aislado EBCAf10, donde los valores de producción se triplican al comparar el tratamiento control con el del PEG al 20%, de un 8.11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 24.59 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

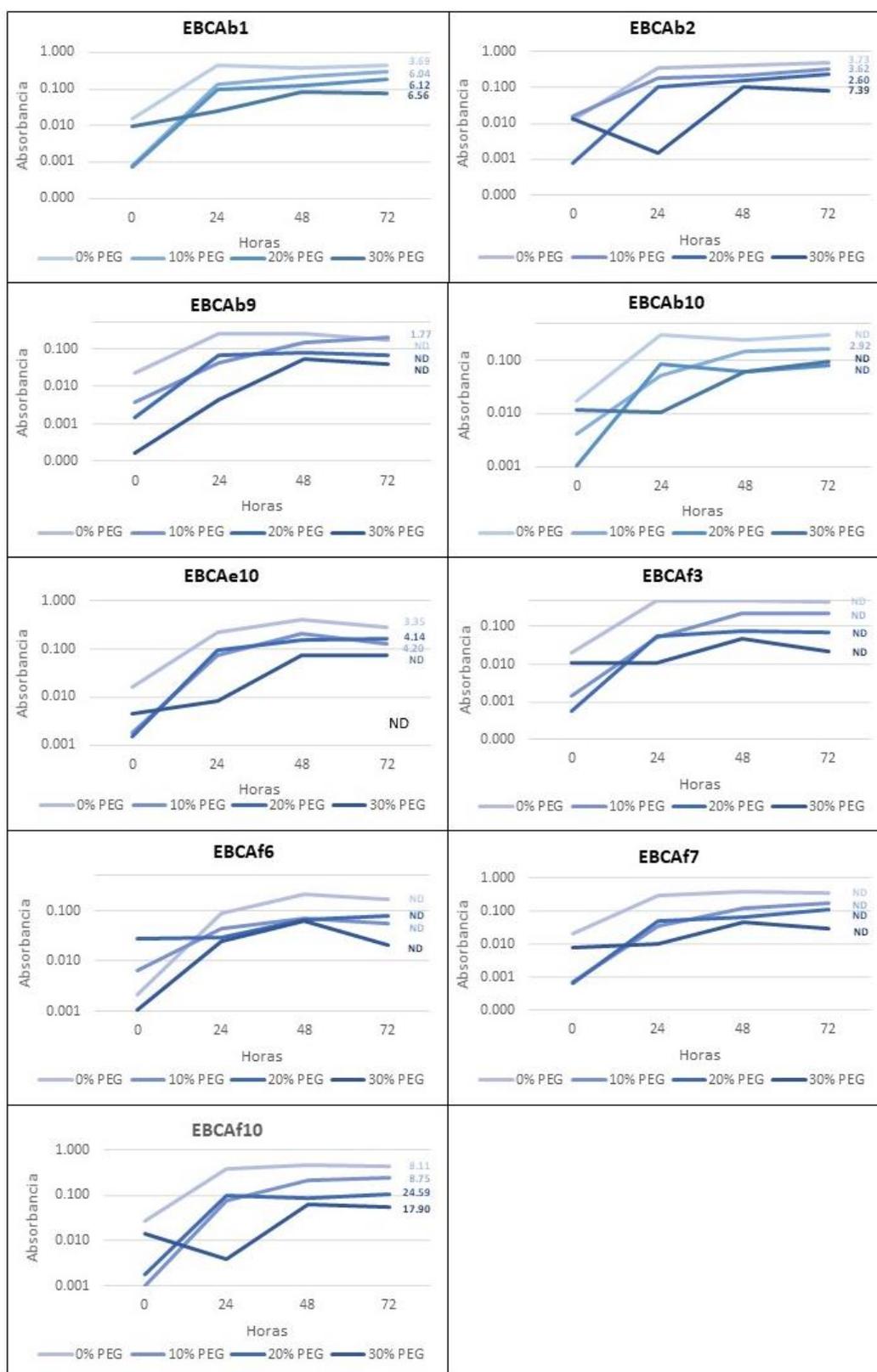


Figura 4. Resultados de la evaluación al estrés hídrico en los aislados potenciales como PGPR. En la región superior se indica el aislado según la gráfica; a la derecha la producción de AIA ($\mu\text{g}/\text{ml}$): (ND): no se detectó producción.

3.4. Evaluación de la tolerancia a la salinidad

Al igual que en la sección anterior esta prueba se realizó con los aislados con mayor potencial como PGPR caracterizados en la primera serie de pruebas, en este caso: EBCAb1, EBCAb2, EBCAb6, EBCAb9, EBCAb10, EBCAf10, EBCAe10, EBCAf3, EBCAf6, EBCAf7, y EBCAf10. La mayoría de los aislados mantuvo la misma curva de crecimiento en las diferentes concentraciones de PEG. El aislado EBCAb6 mostró menor crecimiento en condiciones de salinidad al 0.5% y 3%. EBCAf6 mostró un aumento en la absorbancia en los medios adicionados con NaCl al 1% y 3%, entre las 48 y 72 horas (Figura 8), mientras que hay un descenso en el tratamiento al 0.5%. En el caso de EBCAf10 se observó un descenso de la absorbancia las primeras 24 horas de incubación en los tratamientos al 1% y 3%, pero entre las 24 y 48 horas hay una recuperación, lográndose adaptar y mostrando niveles de absorbancia comparables con el control.

En cuanto a la producción de AIA se observaron casos muy marcados donde se dio un ascenso en la producción de la fitohormona a mayor concentración del PEG a la que se habían inoculado los aislados bacterianos. Por ejemplo, el aislado EBCAb6 produjo 1.89 $\mu\text{g/ml}$ en el tratamiento control (0% NaCl) y la producción asciende hasta un 14.02 $\mu\text{g/ml}$ con el tratamiento de NaCl al 3%. EBCAf10 mostró un comportamiento similar a lo que se encontró en la sección anterior. Se observó 5.31 $\mu\text{g/ml}$ en el control y una lectura de valor máximo con NaCl al 1%, indicando que el valor fue superior a 100 $\mu\text{g/ml}$. Para EBCAf6 ocurre lo contrario. En el tratamiento control se observa una producción de 14.97 $\mu\text{g/ml}$ y disminuye a mayor concentración de sal: 2.31 $\mu\text{g/ml}$ al ser inoculado con NaCl al 3%.

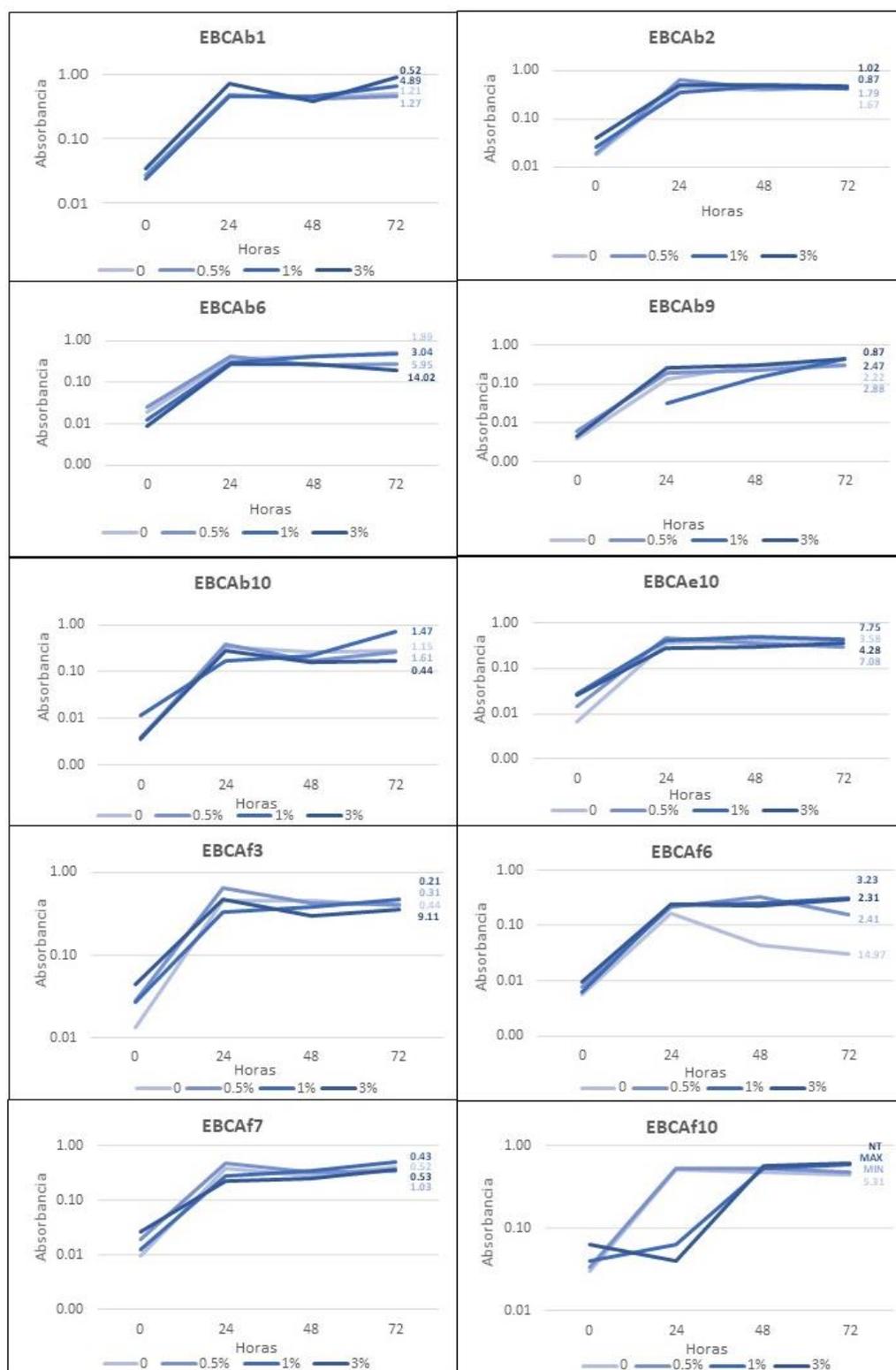


Figura 5. Resultados de la evaluación a la resistencia por salinidad en los aislados potenciales como PGPR. En la parte superior se indica el aislado según la gráfica; a la derecha la producción de AIA ($\mu\text{g}/\text{ml}$); (ND): no se detectó producción; (NT): no se probó en el aislado.

3.5. Identificación de los aislados mediante la secuenciación del gen RNAr 16s

Se identificaron 15 de los 33 aislados, la mayoría de las cepas pertenecen a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*. Estos grupos son de los géneros que comúnmente se identifican como PGPR. Aislados de *Bacillus* sp. principalmente resultan ser resistentes a climas áridos gracias a su capacidad de formar biofilms.

Tabla 4. Resultados de la secuenciación del gen RNAr 16s, primer 27F.

Aislado	16s- Primer 27F
EBCAb1	<i>Pseudomonas</i> sp.
EBCAb2	<i>Pseudomonas</i> sp.
EBCAb6	-
EBCAb7	<i>Acinetobacter</i> sp.
EBCAb8	<i>Acinetobacter</i> sp.
EBCAb9	<i>Bacillus</i> sp.
EBCAb10	<i>Bacillus</i> sp.
EBCAc1	<i>Bacillus</i> sp.
EBCAe1	-
EBCAe2	-
EBCAe3	-
EBCAe4	-
EBCAe5	<i>Pseudomonas</i> sp.
EBCAe6	-
EBCAe7	<i>Pseudomonas</i> sp.
EBCAe8	-
EBCAe9	-
EBCAe10	<i>Pseudomonas</i> sp.
EBCAf1	-
EBCAf2	-
EBCAf3	-
EBCAf4	-
EBCAf5	<i>Brevibacillus</i> sp.
EBCAf6	<i>Bacillus</i> sp.
EBCAf7	-
EBCAf8	-
EBCAf9	-
EBCAf10	-
EBCAg1	<i>Siccibacter</i> sp.
EBCAg2	<i>Pseudomonas</i> sp.
EBCAg3	<i>Pseudomonas</i> sp.

En la columna de la izquierda se encuentra el nombre del aislado y a la derecha el género de las coincidencias más cercanas de acuerdo a NCBI.

3.6. Detección del gen *nifH* en diazótrofas de vida libre

Se logró la detección del gen *nifH* (aprox. 450 pb) mediante el protocolo de *Nested Primers* reportado por Montañez et al., (2017). Estos fueron: EBCAb1, EBCAb2, EBCAb7 y EBCAb8 (Figura 6). De acuerdo a la identificación molecular pertenecen a los géneros *Pseudomonas* y *Acinetobacter*.



Figura 6. Gel de electroforesis con amplificación del gen *nifH*. Escalera (*Ladder*) de 1 kb pb a los extremos. Se observan diferentes bandas de amplificación para algunos aislados.

3.7. Ensayos *in vitro* de germinación en semillas de solanáceas

En tomate el mayor porcentaje de germinación se observó en las semillas que habían sido inoculadas con EBCAb2 (Tabla 5), alcanzándose un 95.83% del total de las semillas a las 96 horas post incubación (hpi). En las semillas con los tratamientos de EBCAe10 y EBCAb10 se observó la germinación más baja, 83.33% en ambos casos.

En el análisis comparativo entre medias (Figura 7) comparando con el control, se encontró diferencias significativas del hipocótilo en las semillas inoculadas con los aislados EBCAe10 y EBCAf10. Asimismo, en radículas las diferencias se dieron en las semillas tratadas con los aislados EBCAe10, EBCAf3, EBCAf6 y EBCAf10. Las diferencias con los tratamientos EBCA e10 y EBCAf10 son a la baja.

Tabla 5. Porcentajes de germinación de semillas de tomate Bonnie best.

Tratamiento	24 hpi	48 hpi	72 hpi	96 hpi	120 hpi
Bs	0	58.33	70.83	83.33	87.50
Control	0	41.67	79.17	83.33	83.33
EBCAb1	0	62.50	70.83	79.17	87.50
EBCAb2	0	50	87.50	95.83	95.83
EBCAb6	0	54.17	83.33	83.33	87.50
EBCAb9	0	54.17	66.67	83.33	87.50
EBCAb10	0	45.83	75.00	79.17	83.33
EBCAe10	0	37.50	70.83	79.17	83.33
EBCAf3	0	54.17	83.33	83.33	91.67
EBCAf6	0	70.83	91.67	91.67	95.83
EBCAf7	0	58.33	87.50	87.50	95.83
EBCAf10	0	62.50	75	83.33	87.50

Se muestran los porcentajes para: (hpi) horas post incubación, (Bs): tratamiento de *Bacillus subtilis* con el aislado de BACTISHOCK[®].

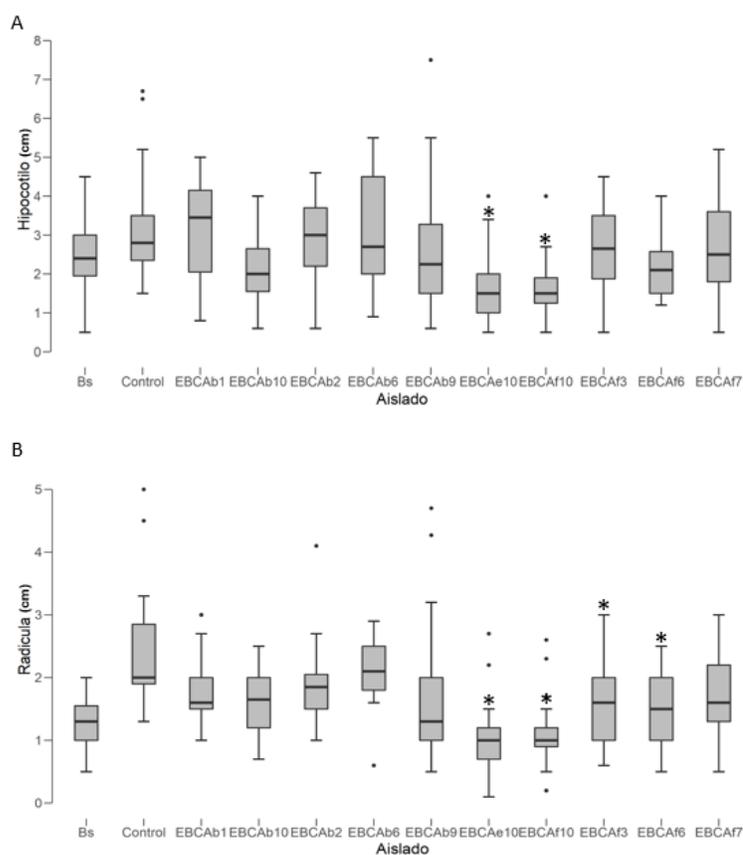


Figura 7. Diagramas de caja para las mediciones de los tejidos de plántulas de tomate. (A): hipocótilo; (B): radícula. (Bs): tratamiento de *Bacillus subtilis* con el aislado de BACTISHOCK[®]. (•)- indica outliers y (*)- tratamientos que mostraron ser significativos en comparación con el control.

En Chile serrano se observó un 100% de germinación únicamente en las semillas tratadas con el aislado EBCAf10 desde las 144 horas (Tabla 6). A pesar de esto, no había una abertura total de la semilla y el tejido se observaba debilitado e incluso con oscurecimiento, del mismo por lo que no se logró obtener medidas de los tejidos. EBCAf3 mostró el porcentaje mínimo de germinación con un 58.3%. Mediante el análisis comparativo de medias no se encontraron diferencias significativas en las semillas tratadas con los aislados en las medidas del hipocótilo y de la radícula (Figura 8).

Tabla 6. Porcentajes de germinación de semillas de Chile serrano.

Tratamiento	24 hpi	48 hpi	72 hpi	96 hpi	120 hpi	144 hpi	168 hpi
Bs	0	0	58.3	62.5	75	79.2	79.2
Control	0	0	33.3	62.5	75	75	83.3
EBCAb1	0	0	33.3	66.7	66.7	79.2	79.2
EBCAb2	0	0	37.5	75	79.2	87.5	95.8
EBCAb6	0	0	29.2	58.3	75	91.7	91.7
EBCAb9	0	0	41.7	70.8	75	87.5	87.5
EBCAb10	0	0	62.5	87.5	87.5	91.7	91.7
EBCAe10	0	0	25	62.5	66.7	75	75
EBCAf3	0	0	37.5	41.7	54.2	58.3	58.3
EBCAf6	0	0	37.5	58.3	75	83.3	83.3
EBCAf7	0	0	62.5	91.7	95.8	87.5	95.8
EBCAf10	0	0	37.5	87.5	95.8	100	100

Se muestran los porcentajes. (hpi): horas post incubación; (Bs): tratamiento de *Bacillus subtilis* con el aislado de BACTISHOCK®

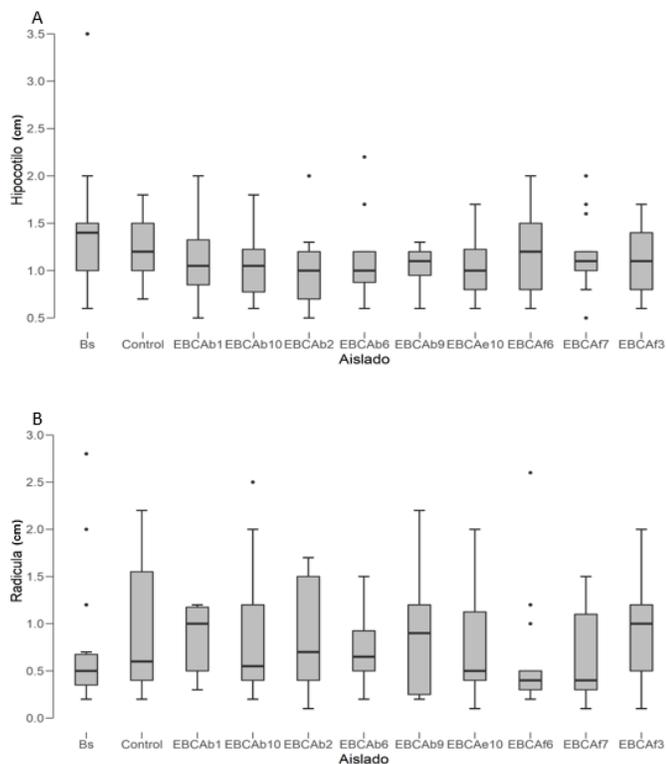


Figura 8. Diagramas de caja para las mediciones de plántulas de Chile serrano. (A): hipocótilo; (B): radícula. (Bs): tratamiento de *Bacillus subtilis* con el aislado de BACTISHOCK®. (•)- indica outliers.

En berenjena (Tabla 7), las semillas inoculadas con EBCAb1, EBCAb2 y EBCAb10 alcanzaron el 100% de germinación a las 120 hpi. Aquellas con el tratamiento de EBCAf3 mostraron el porcentaje mínimo, 87.5% desde las 144 hpi. Las medidas de los tejidos coinciden con los resultados obtenidos en tomate (Figura 9), siendo los casos de EBCAb1 y EBCAb6 en los que se obtuvo el mayor crecimiento en hipocótilo y radícula correspondientemente. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos comparando con el control en ambos tejidos.

Tabla 7. Porcentajes de germinación de semillas de berenjena.

Tratamiento	24 hpi	48 hpi	72 hpi	96 hpi	120 hpi	144 hpi	168 hpi
Bs	0	0	25	66.7	91.7	95.8	100
Control	0	0	12.5	75	83.3	87.5	87.5
EBCAb1	0	0	37.5	79.2	100	100	100
EBCAb2	0	0	12.5	79.2	100	100	100
EBCAb6	0	0	33.3	62.5	83.3	83.3	91.7
EBCAb9	0	0	12.5	37.5	83.3	95.8	100
EBCAb10	0	0	4.2	79.2	100	100	100
EBCAe10	0	0	29.2	66.7	79.2	91.7	91.7
EBCAf3	0	0	16.7	75	75	87.5	87.5
EBCAf6	0	0	8.3	50	91.7	91.7	91.7
EBCAf7	0	0	12.5	54.2	83.3	91.7	91.7
EBCAf10	0	0	25	91.7	95.8	100	100

Se muestran los porcentajes para: (hpi): horas post incubación; (Bs): tratamiento de *Bacillus subtilis* con el aislado de BACTISHOCK®.

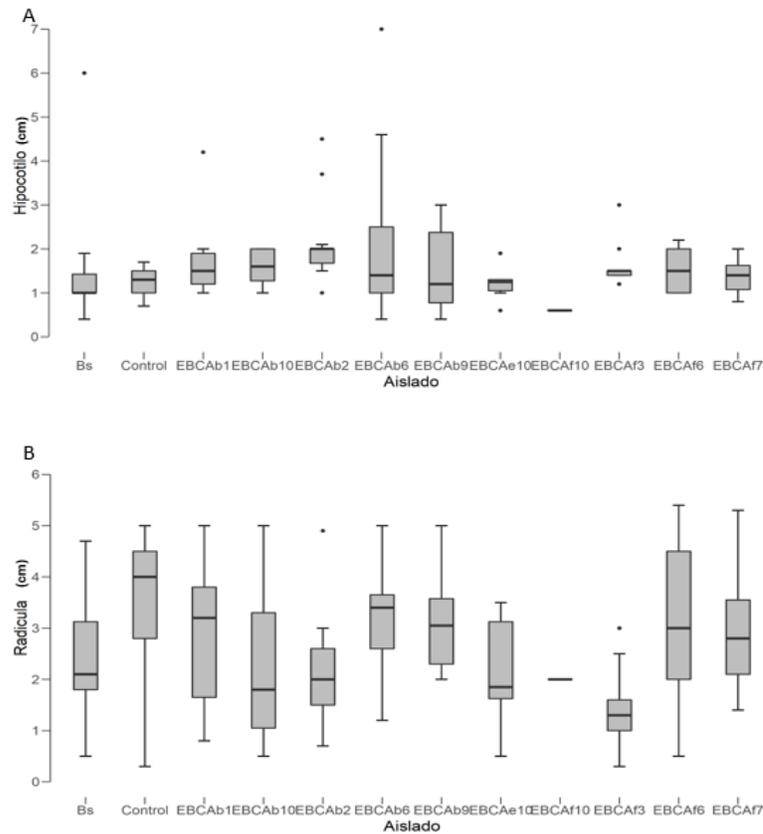


Figura 9. Diagramas de caja para las mediciones de tejidos de plántulas de berenjena. (A): hipocótilo; (B) radícula. (Bs): tratamiento de *Bacillus subtilis* con el aislado de BACTISHOCK®. (•)- indica outliers.

3.8. Variabilidad de la promoción del crecimiento en distintas solanáceas mediante ensayos in vivo en condiciones de invernadero.

3.8.1. Evaluación del efecto de los aislados sobre plantas de rábano

De acuerdo con el análisis estadístico, en rábano las diferencias comparando con el control se encontraron en las variables del peso seco y en el largo específico de la raíz (Figura 10). Para el peso seco de la raíz las diferencias se observaron en las plantas tratadas con el aislado rbES061 (Figura 10D), se observa que los pesos menores se obtuvieron con este tratamiento, la media es 5 veces menos a comparación del control (Tabla 8).

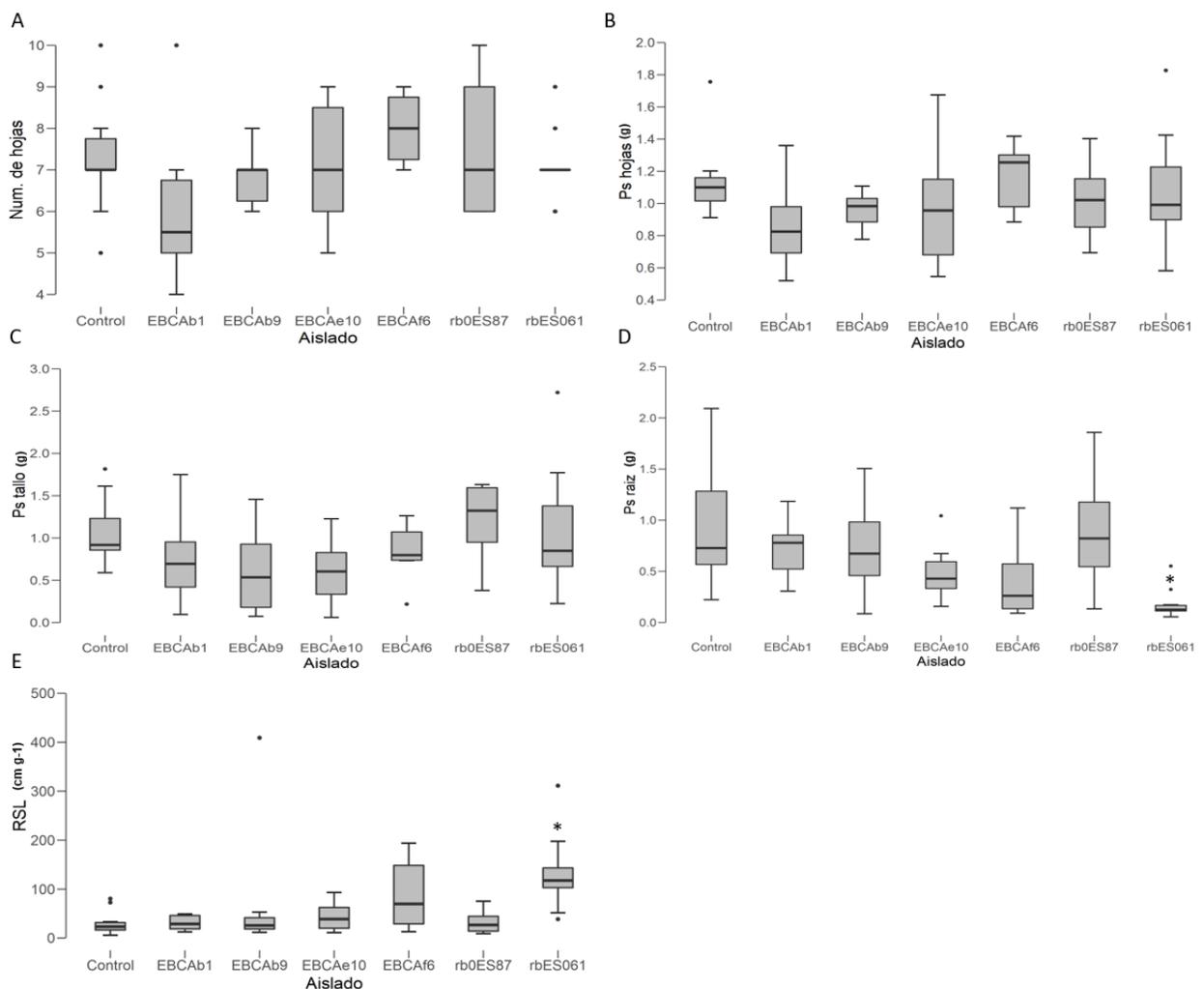


Figura 10. Diagramas de cajas para las mediciones de los parámetros morfométricos en plantas de rábano. (A): número de hojas; (B): peso seco de hojas; (C): peso seco de tallo; (D): peso seco de raíz; (E): RSL- largo específico de raíz. (*)- indica outliers y (*) tratamientos significativos en comparación del control.

Tabla 8. Tasa de cambio de la relación de los parámetros morfométricos comparando con el tratamiento control en plantas de rábano por tratamiento de aislado bacteriano.

Tratamiento	AF	NH	LR	LT	DC	PST	PSR	PSH	LMA	RSL
Control	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>Pseudomonas</i> sp. EBCAb1	0.71	0.84	1.05	0.99	0.82	0.71	0.76	0.76	1.33	1.00
<i>Bacillus</i> sp. EBCAb9	0.82	0.95	1.06	0.84	0.83	0.57	0.75	0.84	1.00	2.11
<i>Pseudomonas</i> sp. EBCAe10	0.76	0.96	0.84	0.84	0.99	0.57	0.51	0.87	1.00	1.38
<i>Bacillus</i> sp. EBCAf6	0.89	1.10	0.91	0.83	0.95	0.76	0.44	1.02	1.33	2.88
<i>Pseudomonas</i> sp. rbES061	0.84	0.97	0.96	0.97	0.96	1.01	0.19	0.94	1.00	4.24
<i>Pseudomonas</i> sp. rbES087	0.86	1.03	1.10	1.05	0.96	1.09	0.94	0.89	1.00	1.09

Cambios a la baja a comparación de control se indican en tonos cálidos; en verde se indican los cambios al alta. Parámetros: (AF)- área foliar, (NH)- número de hojas, (LR)- largo raíz, (LT)- largo tallo, (DC)- diámetro corona, (PST)- peso seco del tallo, (PSR)- peso seco de la raíz, (PSH)- peso seco hojas, (LMA)- área por masa foliar, (RSL)- longitud específica de la raíz.

3.8.2. Evaluación del efecto de los aislados sobre plantas de tomate

En este cultivo las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos comparando con el control se encontraron a nivel del número de hojas para los aislados EBCAb1, EBCAb9, EBCAe10 y rbES087 y en el peso seco de los tallos para el aislado rbES087 (figura 11); en ambos parámetros las diferencias se dieron de manera positiva.

Hay parámetros, para los que inclusive, aunque los tratamientos con los aislados bacterianos no fueron estadísticamente significativos, se observó que existe un aumento en sus medias de los parámetros en comparación con el control. Por ejemplo, en general los seis tratamientos con aislados bacterianos aumentaron el número de hojas. La media es de 6 hojas para el control, mientras que para los tratamientos bacterianos aumenta 1.81 veces para EBCAf6 y hasta 2.32 veces por parte de EBCAe10, semejante al efecto por el aislado rizosférico rbES087 que aumentó 2.36 veces este parámetro en las plantas (Tabla 9). Similarmente, el aislado EBCAe10 aumentó el peso seco de la raíz 1.46 veces más y con el tratamiento de rbES061 se observó una tasa de cambio de 1.61. En el peso seco del tallo, para el tratamiento control la media fue de 1.706 g y con los tratamientos bacterianos aumentó hasta 1.36, 1.40, y 1.41 veces más con los aislados EBCAb9, rbES061 y rbES087, respectivamente.

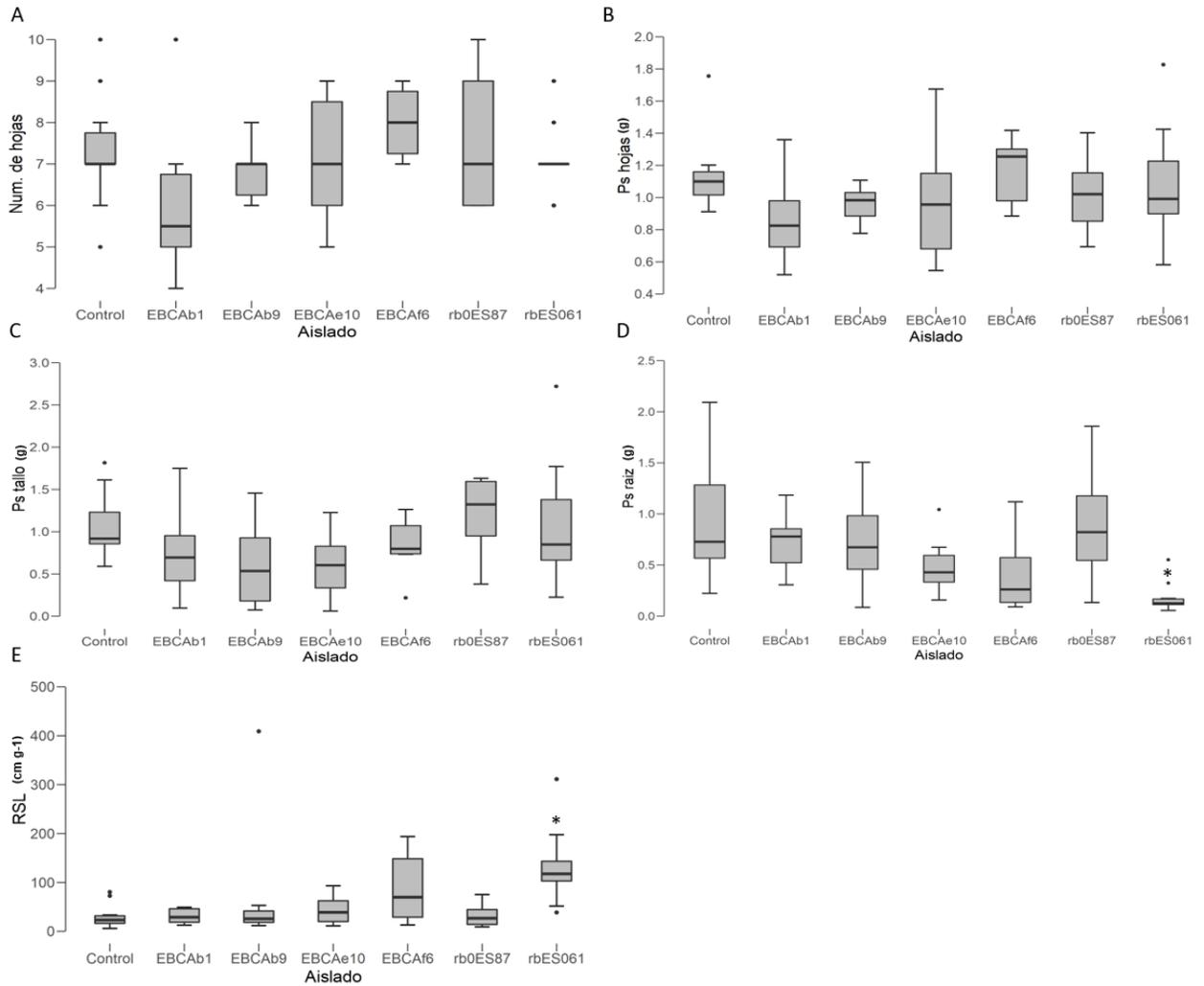


Figura 11. Diagramas de cajas para las mediciones de los parámetros morfométricos en plantas de tomate. (A): número de hojas; (B): peso seco de hojas; (C): peso seco de tallo; (D): peso seco de raíz; (E): RSL- largo específico de raíz. (*)- indica outliers y (*) tratamientos significativos en comparación del control.

Tabla 9. Tasa de cambio de la relación de los parámetros morfométricos comparando con el tratamiento control en plantas de tomate por tratamiento de aislado bacteriano.

Tratamiento	AF	NH	LR	LT	DC	PST	PSR	PSH	LMA	RSL
Control	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>Pseudomonas</i> sp. EBCAb1	1.23	2.31	1.11	0.97	0.93	1.21	1.36	1.15	1.00	0.76
<i>Bacillus</i> sp. EBCAb9	1.33	2.00	1.16	1.06	0.89	1.36	1.46	1.33	1.00	0.68
<i>Pseudomonas</i> sp. EBCAe10	1.34	2.32	1.13	1.06	0.92	1.26	1.38	0.39	1.00	0.79
<i>Bacillus</i> sp. EBCAf6	1.30	1.81	1.07	1.04	0.91	1.01	1.02	1.03	0.83	1.02
<i>Pseudomonas</i> sp. rbES061	1.53	1.97	1.14	0.90	0.97	1.40	1.61	1.23	0.83	0.59
<i>Pseudomonas</i> sp. rbES087	1.36	2.36	1.14	0.94	0.99	1.41	1.22	1.34	1.00	0.76

Cambios a la baja a comparación de control se indican en tonos cálidos; en verde se indican los cambios al alta. Parámetros: (AF)- área foliar, (NH)- número de hojas, (LR)- largo raíz, (LT)- largo tallo, (DC)- diámetro corona, (PST)- peso seco del tallo, (PSR)- peso seco de la raíz, (PSH)- peso seco hojas, (LMA)- área por masa foliar, (RSL)- longitud específica de la raíz.

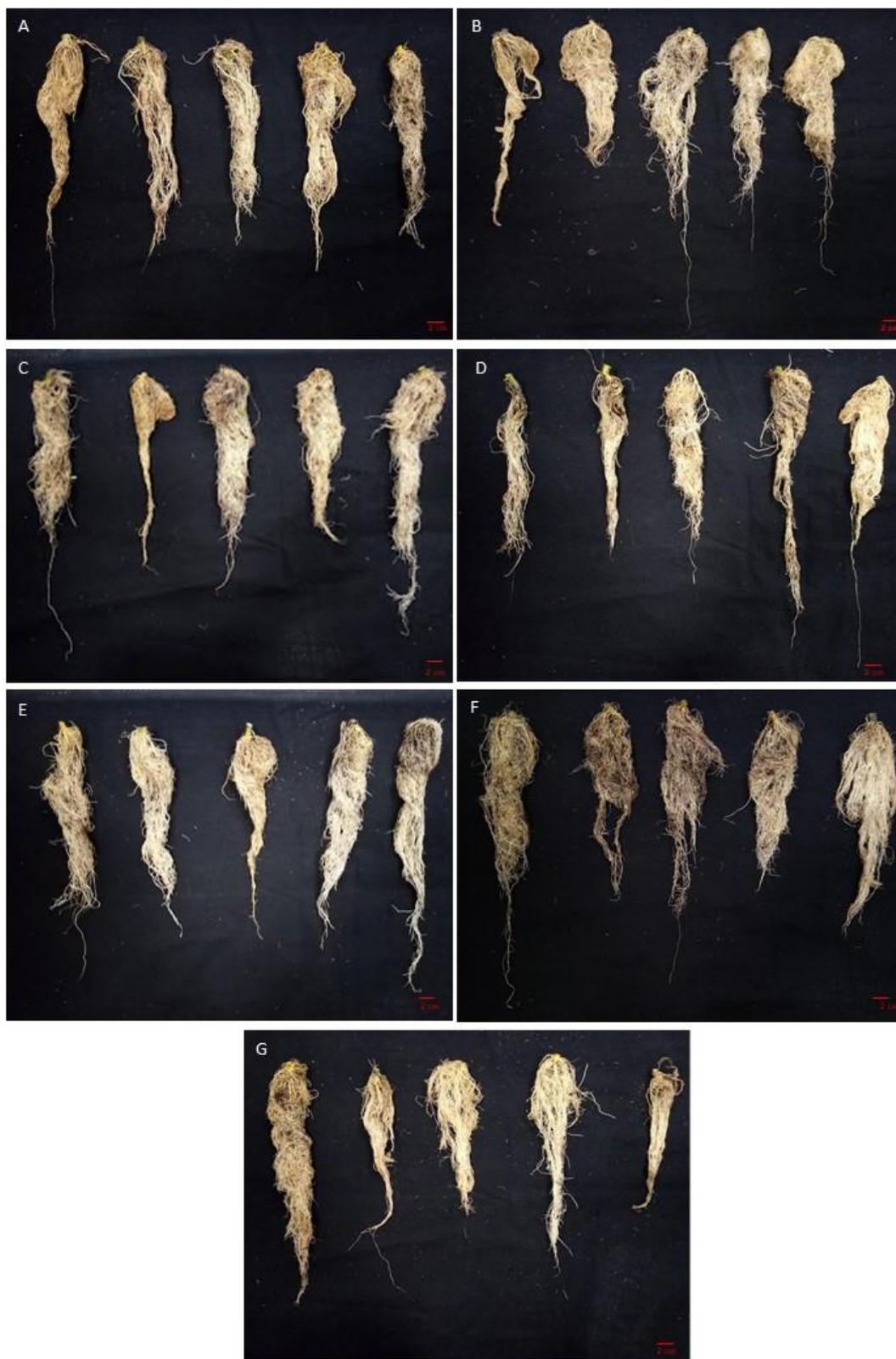


Figura 12. Raíces de tomate procesadas por tratamientos previo al secado. Tratamientos: A) EBCAb1; B) EBCAb9; C) EBCAe10; D) EBCAf6; E) rESE061; F) rbES087; G) Control.

3.8.3. Evaluación del efecto de los aislados sobre plantas de chile

De acuerdo con el análisis estadístico en las plantas de chile las diferencias significativas se dieron en el peso seco de la raíz por el aislado EBCAe10, aumentando el peso 2.30 veces en comparación con el control (Figura 13B). Los resultados son semejantes a los obtenidos en chile, donde las medias del número de hojas y el peso seco de raíz tienden a aumentar con los tratamientos de los aislados bacterianos a comparación del control (Tabla 10). Por ejemplo, EBCAb1 aumentó el número de hojas 1.61 veces más y EBCAe10 2.05 veces. Para el peso seco de la raíz se observa un aumento desde 1.50 veces más por parte de EBCAb9 hasta 2.29 veces por parte del aislado rizosférico rbES087.

Es importante mencionar que, en chile, el tratamiento de EBCAf6 provocó la pérdida de varias réplicas técnicas. Además, se observaron raíces escasamente voluminosas (Figura 14D). Al observar entre tratamientos en las comparaciones *post hoc*, existen diferencias en la medida RSL por parte de este aislado comparando con ambos aislados rizosféricos rbES061 y rbES087.

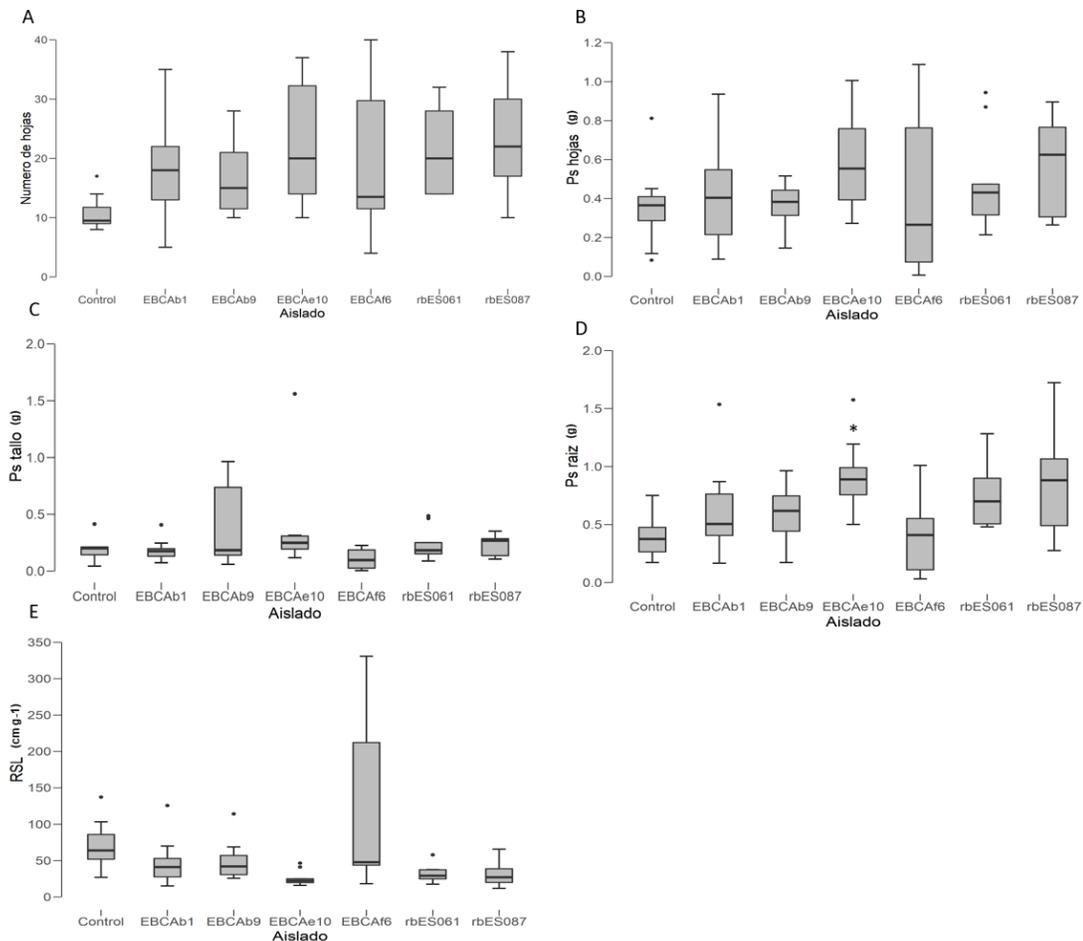


Figura 13. Diagramas de cajas para las mediciones de los parámetros morfométricos en plantas de chile. (A): número de hojas; (B): peso seco de hojas; (C): peso seco de tallo; (D): peso seco de raíz; (E): RSL- largo específico de raíz. (•)- indica datos aislados y (*) tratamientos significativos en comparación del control.

Tabla 10. Tasa de cambio de la relación de los parámetros morfométricos comparando con el tratamiento control en plantas de chile por tratamiento de aislado bacteriano.

Tratamiento	AF	NH	LR	LT	DC	PST	PSR	PSH	LMA	RSL
Control	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>Pseudomonas</i> sp. EBCAb1	1.18	1.72	0.91	1.03	0.94	0.97	1.58	1.14	1.00	0.67
<i>Bacillus</i> sp. EBCAb9	1.18	1.55	1.03	0.88	0.94	2.23	1.50	0.99	1.00	0.71
<i>Pseudomonas</i> sp. EBCAe10	1.58	2.05	0.94	1.32	1.12	1.92	2.30	1.60	1.00	0.36
<i>Bacillus</i> sp. EBCAf6	0.99	1.80	0.78	0.93	0.80	0.56	1.04	1.16	1.75	1.75
<i>Pseudomonas</i> sp. rbES061	1.57	1.94	0.96	1.16	1.03	1.24	1.98	1.33	1.00	0.44
<i>Pseudomonas</i> sp. rbES087	1.85	2.10	0.94	1.17	1.04	1.21	2.29	1.60	1.25	0.43

Cambios a la baja a comparación de control se indican en tonos cálidos; en verde se indican los cambios al alta. Parámetros: (AF)- área foliar, (NH)- número de hojas, (LR)- largo raíz, (LT)- largo tallo, (DC)- diámetro corona, (PST)- peso seco del tallo, (PSR)- peso seco de la raíz, (PSH)- peso seco hojas, (LMA)- área por masa foliar, (RSL)- longitud específica de la raíz.



Figura 14. Raíces de chile procesadas por tratamientos previo al secado. Tratamientos: A) EBCAb1; B) EBCAb9; C) EBCAe10; D) EBCAf6; E) rESE061; F) rbES087; G) Control.

3.8.4. Evaluación del efecto de los aislados sobre plantas de berenjena

En plantas de berenjena se dieron efectos estadísticamente significativos al comparar con el control en el número de hojas por parte de EBCAb9, EBCAe10, EBCAf6 y rbES087 y en el peso seco de raíz al hacer la comparación con EBCAb9, EBCAe10 y rbES87 (Figura 15). Los tratamientos que coinciden en ambos parámetros son EBCAb9, EBCAe10 y rbES087. En el caso de EBCAe10, aumentó hasta 2.30 veces más el peso de las raíces (Tabla 11). En ambos parámetros las diferencias se dan de manera positiva, con mayor número de hojas y mayor peso seco de la raíz con los tratamientos antes mencionados. También, se observaron cambios por parte del aislado bacteriano EBCAb9, aumentando el número de hojas hasta 1.69 veces más. Aun así, todos los tratamientos incrementaron esta variable con un aumento mínimo de 1.24 veces más en las plantas con el tratamiento de rbES061.

Asimismo, en este cultivo se observó que de manera general las plantas tratadas con los aislados bacterianos desarrollaron un mayor número de hojas y peso seco de la raíz. La media para el número de hojas en el tratamiento de control es de 5.4, mientras que con los tratamientos bacterianos se aumentó desde 1.24 veces más en el aislado rizosférico rbES061 hasta 1.69 veces con EBCAb9. Para el peso seco de la raíz los tratamientos bacterianos llegan a duplicar el valor de la media, 0.642 g en el control, y las plantas tratadas con aislados bacterianos van desde de 1.050 g (EBCAb1) hasta 1.288 g (rbES087), lo que equivale a una tasa de cambio de 1.54 y 2.01 a comparación con el control, respectivamente.

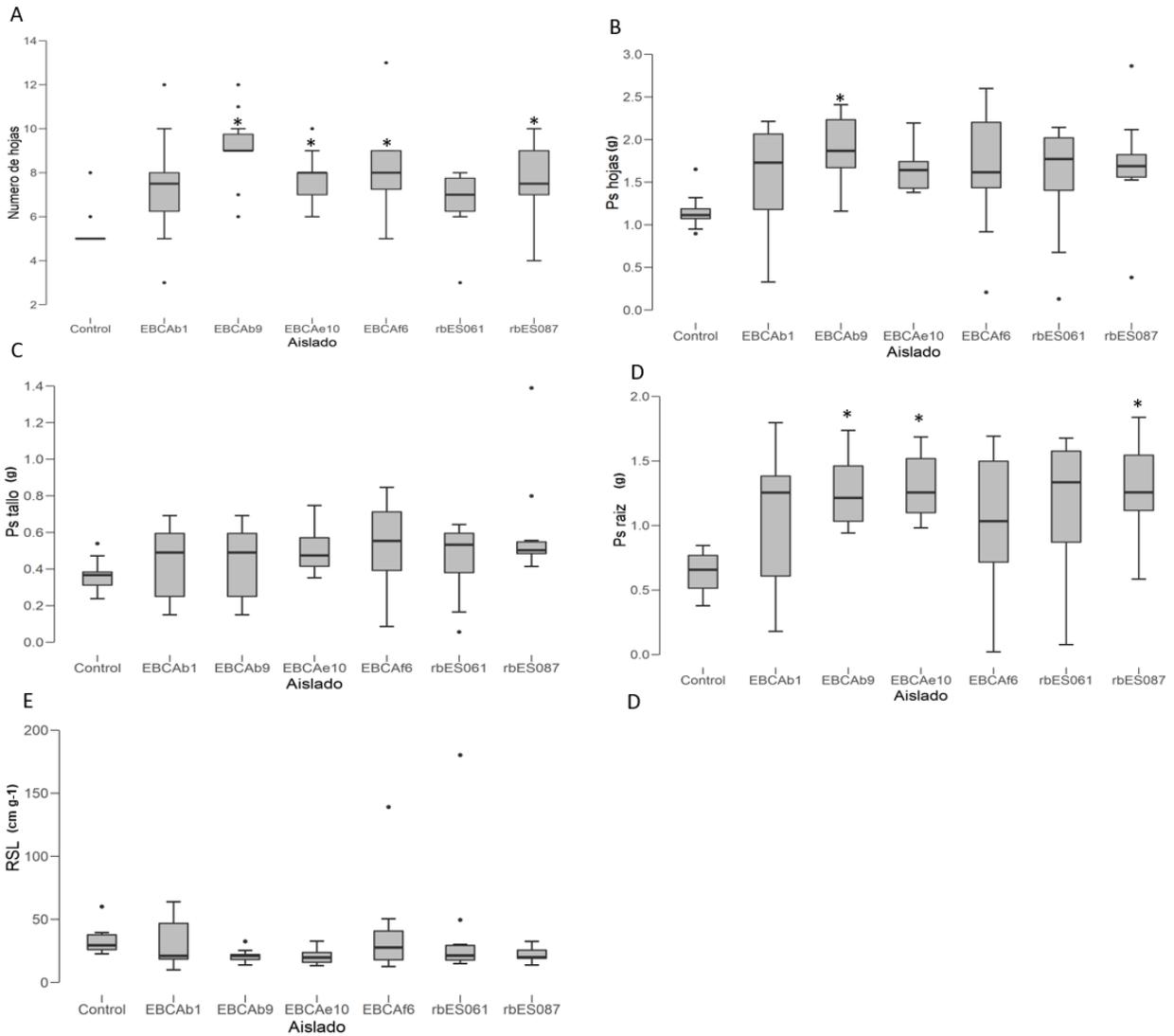


Figura 15. Diagramas de cajas para las mediciones de los parámetros morfométricos en plantas de berenjena. (A): número de hojas; (B): peso seco de hojas; (C): peso seco de tallo; (D): peso seco de raíz; (E): RSL- largo específico de raíz. (•)- indica datos aislados y (*) tratamientos significativos en comparación del control.

Tabla 11. Tasa de cambio de la relación de los parámetros morfométricos comparando con el tratamiento control en plantas de berenjena por tratamiento de aislado bacteriano.

Tratamiento	AF	NH	LR	LT	DC	PST	PSR	PSH	LMA	RSL
Control	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>Pseudomonas</i> sp. EBCAb1	1.10	1.37	1.17	1.22	1.06	1.19	1.64	1.32	1.33	0.94
<i>Bacillus</i> sp. EBCAb9	1.29	1.69	1.28	1.13	1.08	1.19	1.98	1.03	1.33	0.64
<i>Pseudomonas</i> sp. EBCAe10	1.21	1.44	1.29	1.09	1.05	1.37	2.03	1.44	1.33	0.63
<i>Bacillus</i> sp. EBCAf6	1.12	1.52	1.21	1.08	1.04	1.42	1.59	1.45	1.33	1.17
<i>Pseudomonas</i> sp. rbES061	1.06	1.24	1.27	0.98	0.98	1.24	1.79	1.34	2.33	1.20
<i>Pseudomonas</i> sp. rbES087	1.17	1.44	1.33	1.07	1.17	1.65	2.01	1.47	1.67	0.66

Cambios a la baja a comparación de control se indican en tonos cálidos; en verde se indican los cambios al alta. Parámetros: (AF)- área foliar, (NH)- número de hojas, (LR)- largo raíz, (LT)- largo tallo, (DC)- diámetro corona, (PST)- peso seco del tallo, (PSR)- peso seco de la raíz, (PSH)- peso seco hojas, (LMA)- área por masa foliar, (RSL)- longitud específica de la raíz.



Figura 16. Raíces de berenjena procesadas por tratamientos previo al secado. Tratamientos: A) EBCAb1; B) EBCAb9; C) EBCAe10; D) EBCAf6; E) rESE061; F) rbES087; G) Control.

Capítulo 4. Discusión

En este trabajo se logró aislar, caracterizar y determinar el potencial de bacterias endófitas de vida libre del arbusto con distribución nativa en Baja California *Solanum hindsianum*, como promotoras de crecimiento vegetal. Se hipotetizó que debido a que hay una relación más cercana al ser bacterias endófitas y provenientes de una planta de la misma familia, los efectos positivos se potenciarían al comparar con plantas pertenecientes a la misma familia: tomate, chile y berenjena, teniendo como control externo plantas de rábano. Por medio de pruebas bioquímicas y microbiológicas de laboratorio se encontró que los aislados son capaces de solubilizar nutrientes como el fósforo y el potasio, y producir biofilm y reguladores de crecimiento vegetal como el AIA. Más aún, las bacterias mantienen su crecimiento en condiciones de estrés hídrico y de salinidad, condiciones a las que se enfrentan los cultivos en suelos áridos, como es el caso en Baja California. Mediante los ensayos realizados en invernadero se encontró que los aislados endófitos *Pseudomonas* sp. EBCAb1, *Bacillus* sp. EBCAb9, y *Pseudomonas* sp. EBCAe10 son capaces de promover el crecimiento a diferente nivel en plantas de tomate, chile y berenjena, además de confirmar los resultados obtenidos previamente por parte del aislado rizosférico rbES087 aislado de la misma planta nativa.

Al realizar una bioprospección de bacterias promotoras de crecimiento vegetal, ya sean del suelo a granel, de la rizosfera de una planta o endófitas, el primer paso es realizar un escrutinio en el laboratorio de sus características fisiológicas, como la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos, la producción de compuestos volátiles, enzimas y hormonas (Onofre- Lemus et al., 2009, Tenorio- Salgado et al., 2013; Baldani et al., 2014; Otieno et al., 2015). Los que son utilizados como agentes de biocontrol requieren exámenes de patogenicidad estrictos (Velivelli et al., 2014). Trabajos previos han demostrado que no hay un método eficiente y eficaz para identificar PGPR mediante pruebas de laboratorio, puesto que los modos de acción no se han caracterizado completamente (Smyth et al., 2011). Las pruebas de invernadero y campo implican la habilidad de adhesión por parte del aislado bacteriano para posteriormente lograr la colonización al interior de la planta, lo que es un aspecto crítico para que una bacteria benéfica pueda contribuir a la planta (Muñoz- Rojas & Caballero- Mellado, 2003).

En los ensayos de invernadero los cambios efectuados por los aislados bacterianos se dieron generalmente en el peso seco de la raíz y de los tallos. Los aislados que se utilizaron para estos ensayos fueron aquellos donde se observaron los niveles más altos de producción de AIA durante la caracterización *in vitro*. Uno de los principales beneficios de esta fitohormona es el desarrollo de las raíces primarias, las cuales apoyan en el anclaje al suelo de plántulas jóvenes, lo que es fundamental para la obtención de agua

y nutrientes, aumentando su posibilidad de supervivencia, estimulando el desarrollo de pelos radiculares y raíces secundarias (Patten y Glick, 2002; Duca et al., 2014). Los aislados identificados por su gen de RNAr 16s pertenecen en su mayoría al género *Bacillus* y *Pseudomonas*. Cepas de *Pseudomonas* han sido caracterizadas como productoras eficientes de esta fitohormona, además de ser microorganismos modelos en la comprensión de la biosíntesis y efectos sobre distintas plantas (Patten y Glick, 2002). Se ha encontrado también que no es necesaria una alta dosis para lograr un efecto positivo sobre la planta, puesto que altas concentraciones pueden tener efectos adversos; por ejemplo, la inhibición del desarrollo de la raíz primaria (Duca et al., 2014). Existen otros reguladores de crecimiento vegetal como las giberelinas y las citocinas. Las hormonas vegetales no se caracterizan por tener un efecto en específico; su producción puede derivar en efectos a corto y largo plazo, y se ha encontrado que al trabajar en conjunto pueden inducir una determinada expresión morfológica (Jordan y Cassaretto, 2006). Falta determinar qué otros reguladores de crecimiento se encuentran involucrados en los cambios efectuados a nivel de los tejidos aéreos en las plantas.

Al evaluar el crecimiento de los aislados a distintas concentraciones de NaCl en los ensayos de tolerancia a salinidad, se observó que *Bacillus* sp. EBCAb9 mantiene un crecimiento comparable con el control a una concentración de 3%. Más aún, *Pseudomonas* sp. EBCAe10 logró producir ligeramente más AIA al ser inoculado con NaCl al 1%. Los resultados obtenidos son similares con aquellos reportados por Yousef (2018), donde la cepa de *Bacillus subtilis* CW-2 fue capaz de crecer a concentraciones de NaCl al 3% y producir AIA eficazmente a concentraciones a 0.5% y 1% de NaCl. Nghia (2017) también reportó resultados comparables; la cepa *Bacillus* ST2-1 aislada de suelos afectados por salinidad fue capaz de producir AIA eficazmente (33.13 mg L⁻¹) y crecer a concentraciones de salinidad del 3%. Además, tuvo efectos favorables sobre la raíz y biomasa de plántulas de arroz en un experimento *in vivo*.

Posterior a la caracterización por medio de las pruebas bioquímicas y microbiológicas, se observaron efectos no esperados por parte de los aislados. Por ejemplo, en las pruebas de germinación *in vitro*, los aislados EBCAf3 y EBCAf10 mostraron tener un bajo rendimiento. Específicamente, EBCAf10 mostró no ser apto para ensayos de invernadero al debilitar tejidos en las semillas de chile y berenjena; incluso no fue posible obtener medidas de los tejidos. Adicionalmente, al realizar los ensayos de invernadero se observó que EBCAf6 tiene efectos letales al ser inoculados en plantas, principalmente en plantas de chile y rábano, donde el 40% de plantas que recibieron este tratamiento fenecieron.

La actividad promotora de bacterias rizosféricas, ya sea del suelo o endófitas, está relacionada con su capacidad para suprimir los patógenos transmitidos por el suelo. En las pruebas de antagonismo, los

aislados que presentaron actividad antagónica pertenecen en su mayoría al género *Bacillus*. Delgado (2020), aisló bacterias del suelo de la rizosfera de la misma planta y evaluó su actividad antagónica con la misma raza de *F. oxysporum*, encontrando aislados con porcentajes de inhibición que iban desde un 16% a 68%; el 75% fueron identificados como *Bacillus* sp. Se ha reportado que los agentes bacterianos de biocontrol más usados pertenecen a distintas cepas de este género. *B. amyloliquefasciens* FZB42, además de suprimir patógenos que viven en la rizosfera de distintas plantas, es caracterizada por su capacidad para formar biofilms y apoyar en el crecimiento vegetal (Borriss, 2011). El aislado de *Bacillus* EBCAf6 fue el aislado donde se observó la mayor producción de biofilm y actividad antagónica. No obstante, en invernadero no promovió el crecimiento de las plantas, a excepción del aumento en el número de hojas. Por otra parte, *Bacillus* sp. EBCAb9 tuvo efectos positivos en las tres especies vegetales de solanáceas, confirmando que es un aislado capaz de promover el crecimiento vegetal y al mismo tiempo actuar como agente de biocontrol. Falta evaluar la actividad de promoción de crecimiento *in planta* de otros aislados con actividad antagónica. Por ejemplo, tanto EBCAe1 como EBCAc1 presentan morfología de *Bacillus*, producen eficazmente el biofilm y son parte del grupo de aislados que presentaron mayor actividad antagónica, además de producir eficazmente AIA y solubilizar nutrientes.

Previamente se han aislado bacterias de suelos bajo diferentes condiciones de manejo y de las raíces de distintas solanáceas con capacidad de fijar nitrógeno, mediante el empleo de medios libres de nitrógeno, destacando los géneros *Rhizobium*, *Caulobacter*, *Cupriavidus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Variovorax*, y *Paleomonas* (Zuluaga et al., 2020). Los aislados bacterianos recuperados de los medios selectivos para diazótrofos fueron identificados como *Bacillus* sp., *Acinetobacter* sp., y *Pseudomonas* sp. Uno de los principales objetivos al usar estas metodologías es identificar aquellos aislados con potencial para aliviar el estrés por falta de nitrógeno biodisponible, uno de los principales retos a cubrir cuando se trata de la aplicación de biofertilizantes en suelos áridos (Soussi et al., 2016). Guerrieri et al., (2020), aislaron bacterias de la rizosfera de plantas de tomate y seleccionaron PGPRs iniciando la caracterización con la capacidad de éstas de fijar nitrógeno mediante los medios Nfb y LGI; veintinueve de 98 aislados fueron diazótrofos putativos, siendo *Pseudomonas* el género más abundante en el suelo y el rizoplano de la rizosfera. En la identificación molecular del presente trabajo concordó que gran parte de los aislados diazótrofos pertenecen al género *Pseudomonas*. En los ensayos de invernadero *Pseudomonas* EBCAb1 produjo un aumento en el número de hojas y en el peso seco de raíz en plantas de chile y en tomate los efectos siempre fueron positivos en los parámetros evaluados al comparar con el control. *Bacillus* sp. EBCAb9 llegó a duplicar el peso seco de raíz en plantas de berenjena con una tasa de cambio de 1.98 a contrastando con el control, lo que es comparable con el aislado de *Pseudomonas* sp. EBCAe10, que fue el mejor aislado en este cultivo y duplicó el número de hojas y el peso seco de los tallos

y las raíces en plantas de tomate. Es importante mencionar que en el caso de las bacterias que no fueron aisladas a partir de medios libres de N, no significa que no cuenten con el potencial para realizarlo. Trabajos similares ya se han llevado a cabo en solanáceas, por ejemplo, Islam et al. (2013), mediante experimentos gnotobióticos inoculando plantas de chile y tomate con diazótrofos obtuvo un efecto sustancial en una variedad de parámetros relacionados con el crecimiento, como el largo del tallo y de la raíz, vigor de la planta y biomasa del peso seco. El estudio anterior sugiere que los efectos no solo se dieron por esta cualidad de las bacterias que se ha evaluado, sino que están involucrados la producción de enzimas, fitohormonas y solubilización de nutrientes. Así también, aunque la capacidad de fijar nitrógeno por parte de las bacterias puede ser fácilmente probada en condiciones laboratorio, sus efectos en ensayos de campo e invernadero son más complejos y altamente variables.

De acuerdo con las relaciones filogenéticas que se reportan, *S. hindsianum* tiene una relación más cercana con la berenjena (*S. melongena*), más distanciada con el tomate (*S. lycopersicum*) y después se encuentra el género *Capsicum* (Bohs & Olmstead, 1997). Los resultados más claros y concisos, además de ser positivos, se obtuvieron en plantas de berenjena; posiblemente hay una relación filogenética que conlleva a tener beneficios en este caso. Para el tomate, los resultados no se ven claramente debido al tamaño de macetas que se empleó, las plantas se estancaron en el crecimiento de sus raíces, mientras que las chicas continuaban creciendo, observándose diferencias solo en los tejidos aéreos, en el número de hojas y el peso seco de los tallos. En las plantas de chile la principal limitación fueron las condiciones climáticas, el rango de temperatura óptima para su crecimiento va de 20 ° a 30 °C, los experimentos se montaron la primera semana del mes de junio y la temperatura media reportada en la ciudad de Ensenada fue de 19.3 °C. En cuanto a los resultados observados en las plantas de rábano no se encontraron efectos por parte de los aislados sobre este cultivo. La única diferencia estadísticamente significativa se dio con el tratamiento del aislado rbES061 donde el peso seco de la raíz disminuyó; no obstante, en todos los tratamientos la tasa de cambio comparando con el control siempre fue menor al control, por lo que se infiere que las cepas bacterianas utilizadas tienen actividad de promoción de crecimiento vegetal preferentemente en solanáceas.

Por otra parte, el tener 10 réplicas técnicas nos permitió que a pesar de las pérdidas en plantas de chile y rábano fuera posible obtener medidas fiables, pues en todos los casos se tuvieron al menos 6 repeticiones por tratamiento. Realizar experimentos en invernadero conlleva a un ambiente con condiciones semi controladas, propenso a cambios ambientales imprevistos y a la acción de fitopatógenos oportunistas. Los ensayos de evaluación que utilizan distintas especies vegetales requieren un espacio amplio en el invernadero, además de valoraciones constantes, y la obtención de resultados requiere

periodos de tiempo largos. Para tener un primer acercamiento a ensayos de este tipo es recomendable considerar como alternativas el uso de cámaras de crecimiento y medio hidropónico como sustrato en lugar de suelo, lo que disminuye el tiempo requerido para la obtención de resultados, así como el costo de materiales y el espacio requerido.

Este estudio es una primera ventana a la bioprospección de microorganismos como potenciales biofertilizantes. Para la formulación de un producto se requieren una serie de pasos, lo cual incluye pruebas en el laboratorio, ensayos de invernadero y posteriormente de campo. En laboratorio aún falta confirmar la presencia de las cepas bacterianas dentro de los tejidos, evaluar los mecanismos de colonización y estrategias que utilizan dentro de la planta para promover el crecimiento vegetal. Entre los requerimientos a nivel de campo se debe evaluar si son capaces de establecerse o si necesitan ser replicados para mantener su efecto, que el efecto de las cepas sea igual al ser inoculadas en distintos tejidos, como semillas, plántulas o plantas ya adultas, que las cepas se adapten en suelos de pH ácido o básico, que el rendimiento sea igual cuando las cepas solo se aplican a la siembra o en varios momentos del ciclo del cultivo y temporadas, que exista una especificidad entre las cepas y los distintos cultivares y sus variedades, finalizando con un estudio de factibilidad económica.

Capítulo 5. Conclusiones

- Se recuperaron 31 aislados bacterianos endófitos de *Solanum hindsianum*
- Mediante pruebas de caracterización *in vitro* se encontró que 28 aislados son solubilizadores de nutrientes (P y K), 27 producen AIA, 11 producen biofilm eficazmente y 16 cuentan con actividad antagónica.
- No todos los aislados provenientes de *S. hindsianum* tienen efectos positivos en solanáceas de interés agrícola.
- Existen aislados bacterianos de *S. hindsianum* capaces de producir efectos positivos en solanáceas de interés agrícola. Generalmente incrementan la biomasa de las raíces y el número de hojas.
- Mediante esta bioprospección se proponen los aislados *Pseudomonas* sp. EBCAb1, *Bacillus* sp. EBCAb9, y *Pseudomonas* sp. EBCAe10 como biofertilizantes potenciales.

Literatura citada

- Adams, P. D., Kloepper, J. W. 2002. Effect of host genotype on indigenous bacterial endophytes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant and Soil*, 240(1), 181-189.
- Aguirre-Garrido, J. F., Montiel-Lugo, D., Hernández-Rodríguez, C., Torres-Cortes, G., Millán, V., Toro, N., Ramírez-Saad, H. C. 2012. Bacterial community structure in the rhizosphere of three cactus species from semi-arid highlands in central Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101(4), 891-904.
- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M. S. 2008. Screening of free-living rhizosferic bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163, 173–181. doi: 10.1016/j.micres.2006.04.001.
- Amezcuca, R., Lara, F. 2016. El zinc en las plantas. *Universidad Nacional Autónoma de México. México*, 68 (3), 28-35. Recuperado el 20 de agosto del 2021, de: https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/68_3/PDF/zinc_plantas.pdf
- Arriaga Cabrera, L. 2000. *Regiones terrestres prioritarias de México*. CONABIO: México. Recuperado el 5 de octubre del 2021 de: <https://iefectividad.conanp.gob.mx>
- Arora, N. K., Kang, S. C., Maheshwari, D. K. 2001. Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. *Current Science*, 673-677.
- Angel, R., Nepel, M., Panhölzl, C., Schmidt, H., Herbold, C. W., Eichorst, S. A., & Wobken, D. 2018. Evaluation of primers targeting the diazotroph functional gene and development of NifMAP–A bioinformatics pipeline for analyzing nifH amplicon data. *Frontiers in microbiology*, 9, 703.
- Andersen, S. B. 2013. *Plant breeding from laboratories to fields*. Rijeka: IntechOpen.
- Aniruddha S., Jubair Al-Rashid. 2013. Analytical protocol for determination of Indole 3- Acetic Acid (IAA) production by Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB).
- Azcón-Bieto, J. T., & Talón, M. M. 2008. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Mcgraw- Hill: España.
- Baldani J. I. 1984. Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com outras espécies deste gênero, em raízes de milho, sorgo e arroz. Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brazil, MSc Thesis
- Baldani, J.I., Reis, V.M., Videira, S.S., Boddey, L.H., Divan-Baldani. V.L. 2014. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant Soil*, 384: 413
- Barreto, D., Valero, N., Muñoz, A., Peralta, A. 2007. Efecto de microorganismos rizosféricos sobre germinación y crecimiento temprano de *Anacardium excelsum*. *Zonas áridas*, 11(1), 240-250.

- Bashan, Y., Levanony, H. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* 51, 1089-1098.
- Bashan, Y., De-Bashan, L. E. 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. In *Advances in agronomy* (Vol. 108, pp. 77-136). Academic Press.
- Berg, G., & Smalla, K. 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS microbiology ecology*, 68(1), 1-13.
- Bohs, L., Olmstead, R. G. 1997. Phylogenetic relationships in *Solanum* (Solanaceae) based on *ndhF* sequences. *Systematic Botany*, 5-17.
- Borja-Bravo, M.; García-Salazar, J.A., Skaggs, R.K. Mexican fresh tomato exports in the North American market: A case study of the effects of productivity on competitiveness. *Can. J. Plant Sci.* 2013,93, 839–850.
- Borriss, R. 2011. Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents in agriculture. In *Bacteria in agrobiolgy: Plant growth responses* (pp. 41-76). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Cassán, F., Diaz-Zorita, M. 2016. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. *Soil Biology and Biochemistry*, 103, 117-130
- Chiang, F. and L.R. Landrum. 2009. Vascular Plants of Arizona: Solanaceae Part Three: *Lycium*. *Canotia*, 5 (1): 17-26
- Corrales-Ramírez, L.C., Sánchez-Leal, L.C., Arévalo-Galvez, Z. Y., Moreno-Burbano, V. E. 2014. *Bacillus*: género bacteriano que demuestra ser un importante solubilizador de fosfato. *Nova*, 12(22), 165-178.
- Delgado- Ramírez, C.S. 2020. Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizosfera de *Solanum hindsianum*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., Glick, B. R. 2014. Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106(1), 85-125.
- Espín, G. 2003. Biología de *Azotobacter vinelandii*. *Microbios en linea*. <http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/index.php> .
- Estrada-Ortiz, E., Trejo-Téllez, L. I., Gómez-Merino, F. C., Núñez-Escobar, R., Sandoval-Villa, M. 2011. Respuestas bioquímicas en fresa al suministro de fósforo en forma de fosfito. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 17(3), 129-138.

- Etesami, H., Alikhani, H. A., Akbari, A. A. 2009. Evaluation of plant growth hormones production (IAA) ability by Iranian soils rhizobial strains and effects of superior strains application on wheat growth indexes. *World Appl Sci J*, 6(11), 1576-1584.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2018. FAOSTAT. Recuperado el 24 de julio de 2020 de: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>
- FIRCO (Fideicomiso de Riesgo Compartido). 2018. Berenjena: hortaliza con muchos beneficios y poco consumida en nuestro país. Recuperado el 10 de septiembre de: <https://www.gob.mx/firco>
- Gaby, J. C., Buckley, D. H. 2012. A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the *nifH* gene of nitrogenase. *PloS one*, 7(7), e42149.
- García, G. D. C. O., & Luna, B. E. G. 2017. Plantas aisladas de zonas naturales protegidas del estado de Guanajuato. *jóvenes en la ciencia*, 2(1), 1576-1579.
- Gordon, S. A., Weber, R. P. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant physiology*, 26(1), 192
- Gray, E. J., Smith, D. L. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil biology and biochemistry*, 37(3), 395-412.
- Guerrieri, M. C., Fanfoni, E., Fiorini, A., Trevisan, M., Puglisi, E. 2020. Isolation and screening of extracellular PGPR from the rhizosphere of tomato plants after long-term reduced tillage and cover crops. *Plants*, 9(5), 668
- Gupta, G., Snehi, S. K., Singh, V. 2017. Role of PGPR in biofilm formations and its importance in plant health. *Biofilms Plant Soil Health*, 27, 27-40.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., Kloepper, J. W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian journal of microbiology*, 43(10), 895-914.
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., van Elsas, J. D. 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in microbiology*, 16(10), 463-471.
- Hartmann, A., Schmid, M., Van Tuinen, D., Berg, G. 2009. Plant-driven selection of microbes. *Plant and Soil*, 321(1-2), 235-257.
- Ingraham, J. L., Ingraham, C. A. 1998. *Introducción a la microbiología. II*. Reverté.
- Islam, M. R., Sultana, T., Joe, M. M., Yim, W., Cho, J. C., Sa, T. 2013. Nitrogen-fixing bacteria with multiple plant growth-promoting activities enhance growth of tomato and red pepper. *Journal of basic microbiology*, 53(12), 1004-1015.

- Jeyaseelan, E.C., Tharmila, S. Niranjan, K. 2012. Antagonistic activity of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. against *Pythium aphanidermatum* isolated from tomato damping off. Archives of Applied Science Research, 4 (4),1623-1627.
- Jordán, M., Casaretto, J. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. *Squeo, F, A., & Cardemil, L.(eds.). Fisiología Vegetal*, 1-28.
- Kawasaki, A., Donn, S., Ryan, P. R., Mathesius, U., Devilla, R., Jones, A., Watt, M. 2016. Microbiome and exudates of the root and rhizosphere of *Brachypodium distachyon*, a model for wheat. *PLoS one*, 11(10).
- Knapp, S., Sagona, E., Carbonell, A. K., Chiarini, F. 2017. A revision of the Solanum elaeagnifolium clade (Elaeagnifolium clade; subgenus Leptostemonum, Solanaceae). *PhytoKeys*, (84), 1.
- Komal R. Kalavati P. 2018. Isolation and screening of zinc mobilizing microorganisms from rhizospheric soil. *Paripex Indian Journal of Research*; 7 (4), 58-60
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115-175.
- López-Alcocer, J. D. J., Lépiz-Ildefonso, R., González-Eguiarte, D. R., Rodríguez-Macias, R., López-Alcocer, E., Olalde-Portugal, V. 2017. Caracterización morfológica y bioquímica de cepas de *Rhizobium* colectadas en frijol común silvestre y domesticado. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(1), 73-81.
- Lara Mantilla, C., Oviedo Zumaqué, L. E., Betancur Hurtado, C. A. (2011). Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar los pastos. *Zootecnia tropical*, 29(2), 187-194
- Little W. J. 2011. A Sonoran Desert Scrapbook: Some Desert Plants of Kino Bay and Vicinity. Dog Ear Publishing: Indianapolis.
- Martínez, H. F. C., Rosero, N. C., Álvarez, A. E. B., Morante-Carriel, J., Malagón, G. C., Jaramillo, M. P. 2015. Aplicación de Rizobacterias que promueven el crecimiento en plantas (PGPR) del género *Pseudomonas* spp como controladores biológicos de insectos y nemátodos-plagas. *Revista Ciencia y Tecnología*, 8(1), 25-30.
- Martínez, M., Vargas-Ponce, O., Rodríguez, A., Chiang, F., Ocegueda, S. 2017. Solanaceae family in Mexico. *Botanical Sciences*, 95(1), 131-145
- McDonald, A. E., Grant, B. R., Plaxton, W. C. 2001. Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. *Journal of plant nutrition*, 24(10), 1505-1519.
- Montañez, A., Blanco, A. R., Barlocco, C., Beracochea, M., Sicardi, M. 2012. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. *Applied Soil Ecology*, 58, 21-28.

- Nghia, N. K., Tien, T. T. M., Oanh, N. T. K., Nuong, N. H. K. 2017. Isolation and characterization of indole acetic acid producing halophilic bacteria from salt affected soil of Rice-Shrimp farming system in the Mekong Delta, Vietnam. *Forestry and Fisheries*, 6(3), 69-77.
- Marusina, A. I., Boulygina, E. S., Kuznetsov, B. B., Tourova, T. P., Kravchenko, I. K., and Gal'chenko, V. F. 2001. A system of oligonucleotide primers for the amplification of nifH genes of different taxonomic groups of prokaryotes. *Microbiology* 70, 73–78. doi: 10.1023/A:1004849022417
- Muñoz-Rojas, J., Caballero-Mellado, J. 2003. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. *Microbial ecology*, 46(4), 454-464.
- Onofre-Lemus, J., Hernández-Lucas, I., Girard, L., Caballero-Mellado, J. 2009. ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in Burkholderia species, and its growth-promoting effect on tomato plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(20), 6581-6590.
- Otieno, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K. J., Dowling, D. N. 2015. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in microbiology*, 6, 745.
- O'Toole G. A. 2011. Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (47), 2437. <https://doi.org/10.3791/2437>
- Parsons, R., Sunley, R. J. 2001. Nitrogen nutrition and the role of root–shoot nitrogen signalling particularly in symbiotic systems. *Journal of Experimental Botany*, 52(suppl_1), 435-443.
- Patten, C. L., Glick, B. R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and environmental microbiology*, 68(8), 3795-3801.
- Pikovskaya, R.I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17, 362–370.
- Ramos E. V., Bonilla B., Aguilar M. 2018. Interacciones entre plantas y bacterias promotoras de crecimiento vegetal. *Revista CITECSA*, 10(15), 23-31.
- Raven, P. H., Evert, R. F., Eichhorn, S. E. 1992. *Biología de las plantas* (Vol. 2). Reverté.
- Restrepo-Correa, S. P., Pineda-Meneses, E. C., Ríos-Osorio, L. A. 2017. Mecanismos de acción de hongos y bacterias empleados como biofertilizantes en suelos agrícolas: una revisión sistemática. *Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(2), 335-351.
- Richardson, A. E., Barea, J.-M., McNeill, A. M., Prigent-Combaret, C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil*, 321(12), 305–339. doi:10.1007/s11104-009-9895-2

- Riveros- Angarita, A. S., Castro-Caicedo, B. L., Cortina-Guerrero, H. A., de Oliveira, B. F., Silva, S. D. V. M., Damaceno, V. O., Rosales, L. C. 2010. *Inducción de resistencia en plantas. Interacción: planta-patógeno* (No. IICA 631.5233 R621). Universidad del Tolima, Ibagué (Colombia) IICA, Bogotá (Colombia).
- Rueda- Puente, E. O. R., Cervantes, T. R. C., Alvarez, J. L. D. D. L., Rangel, P. P., Vargas, G. A. 2018. Bacterial community of rhizosphere associated to the annual halophyte *Salicornia bigelovii* (Torr.).
- Sheoran, N., Nadakkakath, A. V., Munjal, V., Kundu, A., Subaharan, K., Venugopal, V., Kumar, A. 2015. Genetic analysis of plant endophytic *Pseudomonas putida* BP25 and chemo-profiling of its antimicrobial volatile organic compounds. *Microbiological research*, 173, 66-78.
- SIAP. 2019. Avance de Siembras y Cosechas Resumen nacional por estado: Baja California. Consultado el 24 de julio del 2020, de: <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>
- Smyth, E. M., McCarthy, J., Nevin, R., Khan, M. R., Dow, J. M., O'gara, F., Doohan, F. M. 2011. In vitro analyses are not reliable predictors of the plant growth promotion capability of bacteria; a *Pseudomonas fluorescens* strain that promotes the growth and yield of wheat. *Journal of applied microbiology*, 111(3), 683-692.
- Soussi, A., Ferjani, R., Marasco, R., Guesmi, A., Cherif, H., Rolli, E., Cherif, A. 2016. Plant-associated microbiomes in arid lands: diversity, ecology and biotechnological potential. *Plant and Soil*, 405(1-2), 357-370
- Tagele, S. B., Kim, S. W., Lee, H. G., Lee, Y. S. 2019. Potential of novel sequence type of *Burkholderia cenocepacia* for biological control of root rot of maize (*Zea mays* L.) caused by *Fusarium temperatum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 1005.
- Tenorio-Salgado, S., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R., Caballero-Mellado, J., Perez-Rueda, E. 2013. Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. *Bioengineered*, 4(4), 236-243.
- Turner, S., Pryer, K. M., Miao V. P. Palmer, J. D. 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4), 327–338.
- Ueda, T., Suga, Y., Yahiro, N., and Matsuguchi, T. 1995. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of nifH gene sequences. *J. Bacteriol.* 177, 1414–1417. doi: 10.1128/jb.177.5.1414- 1417.1995
- Uren, N. C. 2007. Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*, 2, 1-21.

- Velázquez-Gurrola, A., Ramos-Alegría, M. P. 2015. Beneficios de microorganismos solubilizadores de P y K en la recuperación y mantenimiento de suelos agrícolas. *Lima, Perú. ProHass*, 495-499. http://www.avocadosource.com/WAC8/Section_07/VelazquezGurrolaA2015.pdf
- Velivelli, S. L., De Vos, P., Kromann, P., Declerck, S., Prestwich, B. D. 2014. Biological control agents: from field to market, problems, and challenges. *Trends in Biotechnology*, 32(10), 493-496.
- Venegas Cardoso, F. R., López García, J. 2005. Estudio de algunos procesos pedogenéticos en el valle de Ojos Negros, Baja California, México. *Investigaciones geográficas*, (57), 53-67.
- Vessey, J.K. 2003. Plant and Soil. En: Vessey, J.K (Ed), *Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers*. Springer, 571-586.
- Vikhe, P. S. 2014. Azotobacter species as a natural plant hormone synthesizer. *Research Journal of Recent Sciences ISSN, 2277, 2502*
- Wang, S., Ouyang, L., Ju, X., Zhang, L., Zhang, Q., Li, Y. 2014. Survey of plant drought-resistance promoting bacteria from *Populus euphratica* tree living in arid area. *Indian journal of microbiology*, 54(4), 419-426.
- Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of experimental Botany*, 52(suppl_1), 487-511.
- Xu, M., Sheng, J., Chen, L., Men, Y., Gan, L., Guo, S., Shen, L. 2014. Bacterial community compositions of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds and plant growth promoting activity of ACC deaminase producing *Bacillus subtilis* (HYT-12-1) on tomato seedlings. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(3), 835-845.
- Yeager, C.M., Kornosky, J.L., Housman, D.C., Grote, E.E., Belnap, J., Kuske, C.R., 2004. Diazotrophic community structure and function in two successional stages of biological soil crusts from the Colorado Plateau and Chihuahuan Desert. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 973–983.
- Yousef, N. M. 2018. Capability of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for producing indole acetic acid (IAA) under extreme conditions. *European Journal of Biological Research*, 8(4), 174-182.
- Zani, S., Mellon, M.T., Collier, J.L., Zehr, J.P., 2000. Expression of *nifH* genes in natural microbial assemblages in Lake George, New York, detected by reverse transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (7), 3119–3124.
- Zuluaga, M. Y. A., Lima Milani, K. M., Azeredo Goncalves, L. S., Martinez de Oliveira, A. L. 2020. Diversity and plant growth-promoting functions of diazotrophic/N-scavenging bacteria isolated from the soils and rhizospheres of two species of *Solanum*. *PLoS one*, 15(1), e0227422.

Anexo 1.

Medias de los parámetros evaluados en los ensayos de invernadero por tratamiento.

Tabla 12. Parámetros morfométricos de plantas de rábano.

Tratamiento	Área foliar (Cm ²)	Núm. de hojas	Largo raíz (cm)	Largo tallo (cm)	Diámetro corona (cm)	Peso seco raíz (g)	Peso seco tallo (g)	Peso seco hojas (g)	Área por masa foliar (LMA) (g ^m -2)	Longitud específica de las raíces (RSL) (cm g ⁻¹)
Control	365.89 ± 22.62	7.73 ± 0.44	18.50 ± 1.24	3.81 ± 0.18	1.23 ± 0.08	0.95 ± 0.20	1.08 ± 0.12	1.42 ± 0.07	.003 ± 1.30e-4	31.09 ± 8.00
EBCAb1	259.93 ± 24.76	6.16 ± 0.87	19.48 ± 3.51	3.79 ± 0.56	1.01 ± 0.09	0.72 ± 0.12	0.76 ± 0.23	0.86 ± 0.12	.004 ± 8.31e-4	31.17 ± 6.64
EBCAb9	301.11 ± 15.27	6.90 ± 0.22	19.65 ± 1.86	3.79 ± 0.26	1.02 ± 0.08	0.72 ± 0.13	0.61 ± 0.15	0.95 ± 0.03	.003 ± 1.60e-4	65.65 ± 38.37
EBCAe10	279.89 ± 18.57	7.00 ± 0.049	15.48 ± 1.27	3.20 ± 0.27	1.23 ± 0.14	0.48 ± 0.08	0.61 ± 0.12	0.98 ± 0.11	.003 ± 2.53e-4	42.92 ± 8.50
EBCAf6	326.28 ± 25.01	8.00 ± 0.36	16.83 ± 1.69	3.17 ± 0.26	1.18 ± 0.07	0.41 ± 0.16	0.82 ± 0.15	1.17 ± 0.09	.004 ± 4.54e-4	89.44 ± 31.26
rbES061	308.63 ± 24.88	7.10 ± 0.22	17.74 ± 2.14	3.70 ± 0.30	1.19 ± 0.06	0.18 ± 0.04	1.08 ± 0.23	1.07 ± 0.11	.003 ± 1.96e-4	131.72 ± 24.48
rbES087	314.23 ± 21.05	7.50 ± 0.59	20.33 ± 3.63	3.99 ± 0.22	1.19 ± 0.05	0.89 ± 0.19	1.18 ± 0.17	1.02 ± 0.08	.003 ± 1.90e-4	33.76 ± 9.23

Tabla 13. Parámetros morfométricos de plantas de tomate (*Bonnie best*).

Tratamiento	Área foliar (Cm ²)	Núm. de hojas	Largo raíz (cm)	Largo tallo (cm)	Diámetro corona (cm)	Peso seco raíz (g)	Peso seco tallo (g)	Peso seco hojas (g)	Área por masa foliar (LMA) (g ^m -2)	Longitud específica de las raíces (RSL) (cm g ⁻¹)
Control	434.15 ± 34.58	5.80 ± 0.57	27.57 ± 1.37	32.63 ± 1.71	0.94 ± 0.02	1.09 ± 0.18	1.53 ± 0.17	2.55 ± 0.16	.006 ± 3.72e-4	31.92 ± 5.24
EBCAb1	553.35 ± 72.99	13.42 ± 1.30	30.55 ± 1.74	31.69 ± 1.40	0.88 ± 0.04	1.48 ± 0.23	1.84 ± 0.10	2.93 ± 0.21	.006 ± 4.45e-4	24.24 ± 4.53
EBCAb9	575.82 ± 46.39	11.60 ± 1.34	32.07 ± 1.72	34.43 ± 2.51	0.84 ± 0.03	1.59 ± 0.17	2.08 ± 0.07	3.39 ± 0.18	.005 ± 5.69e-4	21.82 ± 2.18
EBCAe10	584.21 ± 59.86	13.44 ± 1.39	31.11 ± 1.97	33.91 ± 1.41	0.87 ± 0.02	1.50 ± 0.24	1.93 ± 0.10	3.19 ± 0.14	.006 ± 6.24e-4	25.29 ± 3.99
EBCAf6	563.04 ± 70.17	10.50 ± 1.52	29.41 ± 2.21	34.52 ± 1.17	0.86 ± 0.05	1.11 ± 0.19	1.54 ± 0.22	2.63 ± 0.39	.005 ± 3.31e-4	32.70 ± 8.80
rbES061	665.36 ± 66.43	11.42 ± 1.13	31.46 ± 2.28	29.30 ± 1.13	0.92 ± 0.09	1.76 ± 0.20	2.15 ± 0.13	3.14 ± 0.35	.005 ± 7.34e-4	18.81 ± 1.81
rbES087	588.81 ± 63.45	13.71 ± 2.12	31.37 ± 1.18	30.71 ± 2.16	0.93 ± 0.05	1.33 ± 0.09	2.16 ± 0.12	3.41 ± 0.17	.006 ± 4.84e-4	24.33 ± 2.13

Tabla 14. Parámetros morfométricos de plantas de chile serrano.

Tratamiento	Área foliar (Cm ²)	Núm. de hojas	Largo raíz (cm)	Largo tallo (cm)	Diámetro corona (cm)	Peso seco raíz (g)	Peso seco tallo (g)	Peso seco hojas (g)	Área por masa foliar (LMA) (g ^m -2)	Longitud específica de las raíces (RSL) (cm g ⁻¹)
Control	90.36 ± 19.38	10.87 ± 1.09	22.79 ± 0.78	15.10 ± 1.65	0.47 ± 0.04	0.39 ± 0.06	0.19 ± 0.04	0.36 ± 0.07	.004 ± 2.88e-4	71.68 ± 12.50
EBCAb1	106.52 ± 22.32	18.66 ± 3.00	20.84 ± 1.59	15.58 ± 1.44	0.44 ± 0.02	0.62 ± 0.13	0.18 ± 0.03	0.42 ± 0.09	.004 ± 1.91e-4	47.23 ± 11.11
EBCAb9	106.24 ± 20.50	16.85 ± 2.85	23.48 ± 1.36	13.36 ± 0.94	0.44 ± 0.02	0.59 ± 0.10	0.42 ± 0.14	0.36 ± 0.04	.004 ± 2.98e-4	51.07 ± 11.86
EBCAe10	142.77 ± 22.10	22.30 ± 3.32	21.46 ± 1.64	19.90 ± 1.73	0.52 ± 0.03	0.91 ± 0.09	0.36 ± 0.13	0.58 ± 0.07	.004 ± 3.24e-4	25.69 ± 3.19
EBCAf6	89.3 ± 37.48	19.50 ± 5.90	17.70 ± 2.82	14.07 ± 3.78	0.37 ± 0.06	0.41 ± 0.15	0.10 ± 0.03	0.42 ± 0.18	.007 ± 0.003	125.78 ± 55.44
rbES061	141.59 ± 29.40	21.11 ± 2.45	21.88 ± 1.17	17.54 ± 1.74	0.48 ± 0.03	0.78 ± 0.09	0.23 ± 0.04	0.48 ± 0.08	.004 ± 3.36e-4	31.24 ± 4.06
rbES087	167.33 ± 28.11	22.88 ± 3.12	21.45 ± 1.32	17.67 ± 1.19	0.49 ± 0.02	0.90 ± 0.16	0.23 ± 0.02	0.58 ± 0.08	.005 ± 0.001	30.93 ± 5.78

Tabla 15. Parámetros morfométricos de plantas de berenjena

Tratamiento	Área foliar (Cm ²)	Núm. de hojas	Largo raíz (cm)	Largo tallo (cm)	Diámetro corona (cm)	Peso seco raíz (g)	Peso seco tallo (g)	Peso seco hojas (g)	Área por masa foliar (LMA) (g ⁻¹ m ⁻²)	Longitud específica de las raíces (RSI) (cm g ⁻¹)
Control	357.49 ± 16.48	5.40 ± 0.30	20.00 ± 1.03	10.49 ± 0.30	0.58 ± 0.01	0.64 ± 0.05	0.36 ± 0.02	1.15 ± 0.06	.003 ± 6.85e-5	33.10 ± 3.50
EBCAb1	394.33 ± 43.24	7.40 ± 0.79	23.35 ± 2.28	12.75 ± 1.67	0.61 ± 0.04	1.05 ± 0.17	0.43 ± 0.06	1.52 ± 0.06	.004 ± 2.32e-4	31.21 ± 6.52
EBCAb9	459.88 ± 18.11	9.10 ± 0.54	25.63 ± 0.81	11.82 ± 0.51	0.62 ± 0.01	1.27 ± 0.09	0.43 ± 0.06	1.89 ± 0.12	.004 ± 2.06e-4	21.03 ± 1.67
EBCAe10	431.33 ± 25.88	7.80 ± 0.35	25.89 ± 1.40	11.48 ± 0.60	0.60 ± 0.04	1.30 ± 0.07	0.50 ± 0.04	1.66 ± 0.08	.004 ± 2.06e-4	20.75 ± 2.04
EBCAf6	399.14 ± 47.41	8.20 ± 0.68	24.28 ± 2.60	11.36 ± 0.92	0.60 ± 0.04	1.02 ± 0.17	0.52 ± 0.07	1.68 ± 0.23	.004 ± 2.76e-4	38.74 ± 11.79
rbES061	380.41 ± 46.25	6.70 ± 0.47	25.49 ± 1.69	10.26 ± 0.80	0.56 ± 0.04	1.15 ± 0.17	0.45 ± 0.06	1.54 ± 0.21	.007 ± .004	39.66 ± 15.95
rbES087	419.47 ± 35.24	7.80 ± 0.57	26.61 ± 1.25	11.24 ± 0.14	0.67 ± 0.02	1.28 ± 0.11	0.60 ± 0.09	1.69 ± 0.19	.005 ± .002	21.89 ± 1.70

Anexo 2.

Aislamiento de rizobiáceas de plantas leguminosas y de *Vitis girdiana* en Ensenada, Baja California.

El proyecto en primera instancia tenía como objetivo el aislamiento y caracterización de bacterias diazótrofes provenientes de plantas leguminosas usadas habitualmente como cultivo de cobertura en la zona vitivinícola del Valle de Guadalupe y de la vid silvestre con distribución nativa en Baja California *Vitis girdiana*. Desafortunadamente este debió ser cambiado debido a la pandemia causada por el virus SARS-CoV-2, puesto que no fue posible seguir realizando colectas.

Del proyecto principal se realizaron dos colectas, una en la zona vitivinícola del Valle de Guadalupe y otra en el ejido San Carlos, al sur de la ciudad. Para aislar rizobiáceas de plantas leguminosas se utilizó el medio TY, mientras que para aislar de *V. girdiana* se usaron medios selectivos libres de nitrógeno (LGI y nFB). En la siguiente tabla se muestra el lugar y sitio de colecta por aislado, el hospedero vegetal de procedencia, el género por el cual se identificó mediante la secuenciación del gen RNAr 16s y los resultados de las pruebas de caracterización como PGPR:

Tabla 16. Resumen de las características de aislados diazótrofes.

Clave	Sitio	Coordenadas	Hospedero vegetal	Identificación RNAr 16s	Solubilización de nutrientes			Porcentaje de inhibición	AIA (µg/ ml)	Biofilm (550nm)
					Zinc	Fósforo	Potasio			
EBCAa1	Hotel UMMA	32°05'33.2"N 116°34'46.4"W	<i>Lupinus sp.</i>	<i>Mucilaginibacter sp.</i>	+	+	+	10.87	14.05	0.073
EBCAa2	Hotel UMMA	32°05'33.2"N 116°34'46.4"W	<i>Trifolium sp.</i>	<i>Sinorhizobium sp.</i>	-	-	+	-	ND	0.163
EBCAa3	Hotel UMMA	32°05'33.2"N 116°34'46.4"W	<i>Trifolium sp.</i>	<i>Sinorhizobium sp.</i>	-	-	+	-	ND	0.046
EBCAa4	Hotel UMMA	32°05'33.2"N 116°34'46.4"W	<i>Lupinus sp.</i>	<i>Kocuria sp.</i>	-	-	+	-	ND	0.048
EBCAa5	El porvenir	32°02'09.2"N 116°36'18.4"W	<i>Trifolium sp.</i>	<i>Sinorhizobium sp.</i>	-	-	+	-	5.38	0.047
EBCAa6	Deckman's el Mogor	32°02'09.2"N 116°36'18.4"W	<i>Acmispon glaber</i>	<i>Microbacterium sp.</i>	+	+	+	-	7.48	0.382
EBCAa7	El porvenir	32°02'09.2"N 116°36'18.4"W	<i>Trifolium sp.</i>	<i>Sinorhizobium sp.</i>	-	-	+	-	ND	0.166
EBCAa8	Hotel UMMA	32°05'33.2"N 116°34'46.4"W	<i>Acmispon glaber</i>	<i>Caulobacter sp.</i>	-	+	+	-	ND	1.090
EBCAa9	Hotel UMMA	32°05'33.2"N 116°34'46.4"W	<i>Acmispon glaber</i>	<i>Mucilaginibacter sp.</i>	+	-	+	-	ND	0.057
EBCAa10	Hotel UMMA	32°05'33.2"N 116°34'46.4"W	<i>Acmispon glaber</i>	<i>Kocuria sp.</i>	-	-	+	-	ND	0.046
EBCAb3	Ejido San Carlos	31°47'47.2"N 116°29'47.9"W	<i>Vitis girdiana</i>	<i>Phyllobacterium sp.</i>	-	-	+	-	7.74	2.431
EBCAb4	Ejido San Carlos	31°47'13.5"N 116°30'15.3"W	<i>Vitis girdiana</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	+	+	-	-	14.27	0.387
EBCAb5	Ejido San Carlos	31°47'11.4"N 116°30'16.4"W	<i>Vitis girdiana</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	+	-	+	10.54	11.71	1.397

(+): positivo para la prueba; (-): negativo para la prueba; (ND): no se detectó producción.

Este proyecto se puede dividir por una parte en aislados provenientes de plantas leguminosas, y en otra en aquellos para *V. girdiana*. En el caso de rizobiáceas se necesita tener un número considerable de aislados, realizar las pruebas de caracterización, y posteriormente la detección de plásmidos en las cepas bacterianas (Eckhardt, 1978), con el objetivo de revisar si aun siendo la misma especie es la misma cepa la que está nodulando el cultivo de cobertura en distintas ubicaciones del Valle de Guadalupe. Por último, es necesario realizar ensayos de nodulación con aquellas cepas que tengan características de PGPR a fin de evaluar su capacidad de colonizar otras leguminosas, inducir la formación de nódulos y su desempeño beneficiando a la planta.

Para el proyecto de *V. girdiana* también es necesario tener un mayor número de aislados, usar distintos medios, caracterizarlos como PGPR, realizar la identificación mediante la secuenciación del gen RNAr 16s, y por último llevar a cabo ensayos de antagonismo *in planta* con aquellos que muestren mayor potencial como antagonistas del fitopatógeno de importancia y a su vez probar el potencial de estos para promover el crecimiento vegetal, ya sea en vides de importancia agrícola, o en plantas que compartan necesidades fisiológicas para desarrollarse que sean similares. Los aislados se encuentran resguardados a -80 °C en la División de Biología Experimental y Aplicada de CICESE, en el Departamento de Microbiología.