



Journal of the Selva Andina Research Society

ISSN: 2072-9294

ISSN: 2072-9308

SELVA ANDINA RESEARCH SOCIETY

García-Reyna, Miriam Judith; Santoyo-Pizano, Gustavo; Hernández-Mendoza, José Luis; Ignacio-De la Cruz, Juan Luis; Sánchez-Yáñez, Juan Manuel  
Respuesta de *Zea mays* a *Burkholderia* spp endófita de *Zea mays* var mexicana (teocintle)  
Journal of the Selva Andina Research Society, vol. 10, núm. 2, 2019, pp. 73-85  
SELVA ANDINA RESEARCH SOCIETY

DOI: <https://doi.org/10.36610/j.jsars.2019.100200073>

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=361362221002>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org



## Respuesta de *Zea mays* a *Burkholderia* spp endófita de *Zea mays* var mexicana (teocintle)

## Responds of *Zea mays* to *Burkholderia* spp endophyte from *Zea mays* var mexicana (teocinte)

García-Reyna Miriam Judith<sup>1</sup>, Santoyo-Pizano Gustavo<sup>1</sup>, Hernández-Mendoza José Luis<sup>2</sup>, Ignacio-De la Cruz Juan Luis<sup>1</sup>, Sánchez-Yáñez, Juan Manuel<sup>1\*</sup>

### Datos del Artículo

<sup>1</sup>Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Francisco J. Mujica S/N, Col. Felicitas del Rio C.P. 58000, Morelia, Mich., México. Laboratorio de Microbiología Ambiental, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Ed-B3 C.U.

<sup>2</sup>Centro de Biotecnología Genómica (CBG), Boulevard del Maestro S/N esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, C.P. 88710, Apartado Postal No. 152, Cd. Reynosa, Tamaulipas, México. Teléfonos: 01 (899) 924 3627 o (55) 57 29 6000, Ext. 87726.

#### \*Dirección de contacto:

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Francisco J. Mujica S/N, Col. Felicitas del Rio C.P. 58000, Morelia, Mich., México. Laboratorio de Microbiología Ambiental, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Ed-B3 C.U.

Juan Manuel Sánchez-Yáñez  
E-mail address: [syanze@umich.mx](mailto:syanze@umich.mx)

### Resumen

*Zea mays* var mexicana o teocintle es una gramínea, considerada como uno de los principales ancestros de *Zea mays*. El teocintle como otras gramíneas, se asocia con géneros de bacterias endófitas promotoras del crecimiento vegetal (BEPCV) en el interior de los tejidos vegetales. *Z. mays* es una gramínea doméstica cultivada normalmente bajo el sistema de producción intensiva, con relativa elevadas dosis de fertilizante nitrogenado (FENI), una posible alternativa de solución para minimizar este problema, es la inoculación de la semilla de *Z. mays* con géneros de BEPCV del teocintle, que colonizan las raíces, los tallos, las hojas y promueven un sano crecimiento a dosis reducida hasta en un 50% FENI como la urea, que equivale a disminuir de 280 kg/ha<sup>-1</sup> a 140 kg/ha<sup>-1</sup>, de lo recomendado para la región del norte de Michoacán y sur de Guanajuato, México. Los objetivos de este trabajo fueron: i) determinar la densidad de *Burkholderia* spp BEPCV de teocintle, ii) analizar el efecto de la inoculación de *Burkholderia* spp de BEPCV en el crecimiento de *Z. mays*, a dosis reducida de FENI en invernadero, iii) identificar *Burkholderia* spp BEPCV de teocintle. Por principio se determinó la densidad de la población de *Burkholderia* spp BEPCV en tejidos (órganos), semillas, tallo-hojas y raíces del teocintle, mediante la siembra de estos, en agar *Pseudomonas cepacia* ácido azelaíco triptamina (PCAT), posteriormente a la incubación, las colonias de *Burkholderia* spp se seleccionaron por la abundancia en: hojas, tallo, raíces y/o semillas, Estos aislados de *Burkholderia* spp, se codificaron con las claves T41 y T42 e inocularon en *Z. mays* sembrado en arena estéril, en donde como única variable-respuesta se determinó el peso seco total comparado el *Z. mays* cultivado con la dosis FENI recomendada, para esa región, se concluyó con la caracterización bioquímica. Los resultados muestran que en *Burkholderia* spp BEPCV de teocintle, se registró una densidad de 3.4 Log UFC/g de peso fresco (GPF) en la raíz, de 3.0 Log UFC/GPF en la semilla y un valor similar en el tallo-hojas de teocintle. La respuesta de *Z. mays* a *Burkholderia* T41 causó un incremento de un 47% en el peso seco de la raíz al amacollamiento, y de un 57% a la extensión del tallo, comparados con el *Z. mays* sin inocular con el nivel máximo de FENI (urea) 280 kg/ha<sup>-1</sup>. El perfil de identificación bioquímica de *Burkholderia* spp apoya una relación genética con *B. vietnamensis*. Se concluye que el teocintle es una fuente de BEPCV para la producción sustentable *Z. mays* a dosis reducida de FENI.

© 2019. Journal of the Selva Andina Research Society. Bolivia. Todos los derechos reservados.

### Abstract

*Zea mays* var mexicana or teocintle is a grass, considered one of the main ancestors of *Zea mays*. Teocinte, like other grasses, is associated with genera of endophytic plant growth promoters (EPGPB) in the interior of plant tissues. *Z. mays* is a domestic grass normally cultivated under the intensive production system, with relatively high doses of nitrogen fertilizer (NIFE), a possible alternative solution to minimize this problem, is the inoculation of the seed of *Z. mays* with genera of EPGPB teocinte, which colonize the roots, stems, leaves and promote a healthy growth at a reduced dose up to 50% NIFE such as urea, which is equivalent to decrease from 280 kg/ha<sup>-1</sup> to 140 kg/ha<sup>-1</sup>, of what is recommended for the region of northern Michoacán and southern Guanajuato, Mexico. The objectives of this work were: i) to determine the density of *Burkholderia* spp BEPCV of teocintle, ii) to analyze the effect of the inoculation of *Burkholderia* spp EPGPB on the growth of *Z. mays*, at reduced dose of NIFE in greenhouse, iii) identify *Burkholderia* spp BEPCV teocintle.

**J. Selva Andina Res. Soc.**  
**2019; 10(2):73-85.**

### Historial del artículo.

Recibido febrero 2019.  
Devuelto mayo 2019.  
Aceptado junio, 2019.  
Disponible en línea, agosto 2019.

**Edited por:**  
**Selva Andina**  
**Research Society**

**Key words:**

Teocinte,  
endophytic bacteria,  
biological fixing N<sub>2</sub>,  
N fertilizer,  
*Z. mays*.

cinte. The population density of *Burkholderia* spp EPGPB was determined in tissues (organs), seeds, stem-leaves and roots of teocinte by sowing them on *Pseudomonas cepacia* azelaic acid tryptamine (PCAT), after incubation. *Burkholderia* spp colonies were selected for abundance in: leaves, stem, roots and/or seeds. These isolates of *Burkholderia* spp, were coded with the keys T41 and T42 and inoculated in *Z. mays* sown in sterile sand, where as the only variable-response the total dry weight was determined compared to the *Z. mays* cultivated with the recommended NIFE dose, for that region, it was concluded with the biochemical characterization. The results show that in *Burkholderia* spp BEPCV of teocinte, a density of 3.4 Log CFU/g of fresh weight (GPF) was registered in the root, of 3.0 Log CFU/GPF in the seed and a similar value in the stem-leaves of teocinte. The response of *Z. mays* to *Burkholderia* T41 caused an increase of 47% in the dry weight of the root to the tillering, and of 57% to the extension of the stem, compared with the *Z. mays* without inoculating with the maximum level of NIFE (urea) 280 kg/ha<sup>-1</sup>. The biochemical identification profile of *Burkholderia* spp supports a genetic relationship with *B. vietnamensis*. It is concluded that teocinte is a source of EPGPB for sustainable production *Z. mays* at a reduced dose of NIFE.

© 2019. Journal of the Selva Andina Research Society. Bolivia. All rights reserved.

## Introducción

La gramínea *Zea mays* (maíz) es importante en México y el mundo por los múltiples usos en especial en la industria alimenticia, con un promedio de *Z. mays* solo a finales del 2000 de 22x10<sup>6</sup> ton/año<sup>1</sup>, el 50% se destina a consumo humano, de ahí la principal forma de este grano básico, es el sistema intensivo, caracterizado por aplicar elevada dosis de fertilizante nitrogenado (FENI) en función de la variedad, tipo de suelo, así como de plaguicidas y agua.<sup>2-4</sup> Una solución alternativa para racionar y optimizar el FENI en *Z. mays*, es la inoculación de semilla a la siembra con géneros y especies de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV)<sup>4,5</sup>, para acelerar la germinación, colonizar las raíces e inducir un crecimiento sano, a través de la conversión de los exudados tanto de la semilla como del sistema de raíz, una amplia variedad de sustancias promotoras de crecimiento vegetal (SUPOCEVE) como el ácido-3-indol acético (AIA), que estimula la proliferación de pelos radicales, giberelinas y citocininas que mejoran la absorción radical para optimizar cualesquier dosis reducida de FENI.<sup>6</sup> En consecuencia, la selección de géneros y especies de bacteria endófitas promotoras de crecimiento vegetal (BEPCV) que sean competitivas y efectivas en la reducción de la

dosis de FENI para la producción sustentable del *Z. mays*, es posible a partir de gramíneas silvestres genéticas relacionadas con *Z. mays* como *Zea mays var mexicana* o teocintle.<sup>7-9</sup> Las BEPCV inoculadas en semillas de *Z. mays* podrían minimizar el impacto negativo de los factores bióticos, que les impiden apoyar la producción sustentable de *Z. mays*, uno de los más limitantes es la competencia con la población microbiana nativa, el cual se suma a la degradación por protozoarios y/o la lisis por bacteriófagos que reducen la actividad de las BEPCV para ejercer el efecto positivo en la semilla y planta. Mientras que factores abióticos, como los drásticos cambios de temperatura, la disponibilidad de agua, o carencia de suficientes de compuestos orgánicos e inorgánicos de N (nitrógeno), P (fósforo) y K (potasio), que evitan la supervivencia y/o crecimiento de géneros y especies de BEPCV antes de colonizar raíces de as diversas variedades de *Z. mays* cultivadas en el mundo. Un factor crítico limitante de la inoculación de *Z. mays* con BEPCV es el origen, en general si provienen de otra gramínea doméstica, no son competitivas en la colonización de la rizosfera de *Z. mays*.<sup>8,10,11</sup> Una alternativa poco explorada, es el empleo de géneros y especies de BEPCV de teocintle, una gramínea con estrecha relación genética con el *Z. mays*<sup>11-14</sup>, que crece en suelos pobres en

sales de N, P y K, de escasa humedad que causan stress por sequía, con capacidad de tolerar el ataque de fitopatógenos aéreos y radicales.<sup>15-17</sup> Por lo anterior se supone una respuesta positiva de *Z. mays* a *Burkholderia* spp (BEPCV) de teocintle a dosis reducida del FENI recomendado para las diferentes regiones de producción, e incluso sin FENI.<sup>11,18-20</sup> Las especies del género *Burkholderia*, endófitas tienen la ventaja de realizar la actividad benéfica desde el interior de los tejidos vegetales en comparación con las BPCV aisladas de plantas domésticas que ejercen la acción positiva desde el exterior del sistema radical.<sup>21,22</sup> Con base a la diversidad de mecanismos específicos de las BEPCV en plantas, se supone que las aisladas de teocintle pueden ser una mejor opción a los inoculantes de BPCV para la reducción y optimización del FENI, en la producción sustentable de un mayor diversidad de variedades de *Z. mays*.<sup>9,16,18,19</sup> Lo anterior se apoya en la información reportada en literatura sobre 54 géneros y 129 especies de BPCV de valor comercial.<sup>16,23-29</sup> En contrate investigación señalan otros géneros y especies de BEPCV como: *Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp y *Enterobacter* sp.<sup>30,31</sup> aisladas de *Ananas comosus*<sup>32,33</sup> y de *Burkholderia brasiliensis* recuperada de *Gossypium herbaceum*. Mientras que la respuesta de *Oryza sativa* a *B. vietnamensis* por SUPOCEVE a una dosis reducida de FENI<sup>34,35</sup>, causo un aumento 49% en el peso radical comparado con *O. sativa* sin inocular a la dosis de FENI recomendada para la región. En tanto que a respuesta de *O. sativa* a *Burkholderia* spp sin FENI, en cuyo caso en el sistema de conducción: floema y xilema<sup>16,34,36,37</sup>, por la fijación biológica del N<sub>2</sub> incremento hasta en un 50% el N total. Otro ejemplo fue la respuesta positiva de *Saccharum officinarum* a *B. brasiliensis* que en mejoró en un 25% el rendi-

miento<sup>18,33</sup> comparada con la respuesta *S. officinum* cultivada con la dosis de FENI recomendada. En general la investigación sobre la respuesta positiva de plantas domésticas a *Burkholderia* spp endófita es amplia<sup>22,23,27-29,38</sup>, pero mínima en gramíneas silvestres como el teocintle, como tampoco en relación a la respuesta favorable de *Z. mays* a *Burkholderia* endófita a dosis reducida de FENI hasta un 50% de urea, de acuerdo a lo recomendado en el norte de Michoacán y sur del bajío guanajuatense para el cultivo de *Z. mays*. Por lo anterior los objetivos de este trabajo fueron: i) aislar BEPCV de teocintle para *Z. mays*; ii) analizar la respuesta de *Z. mays* a *Burkholderia* spp con y sin FENI en invernadero y campo ii) Identificar las BEPCV de teocintle.

## Materiales y métodos

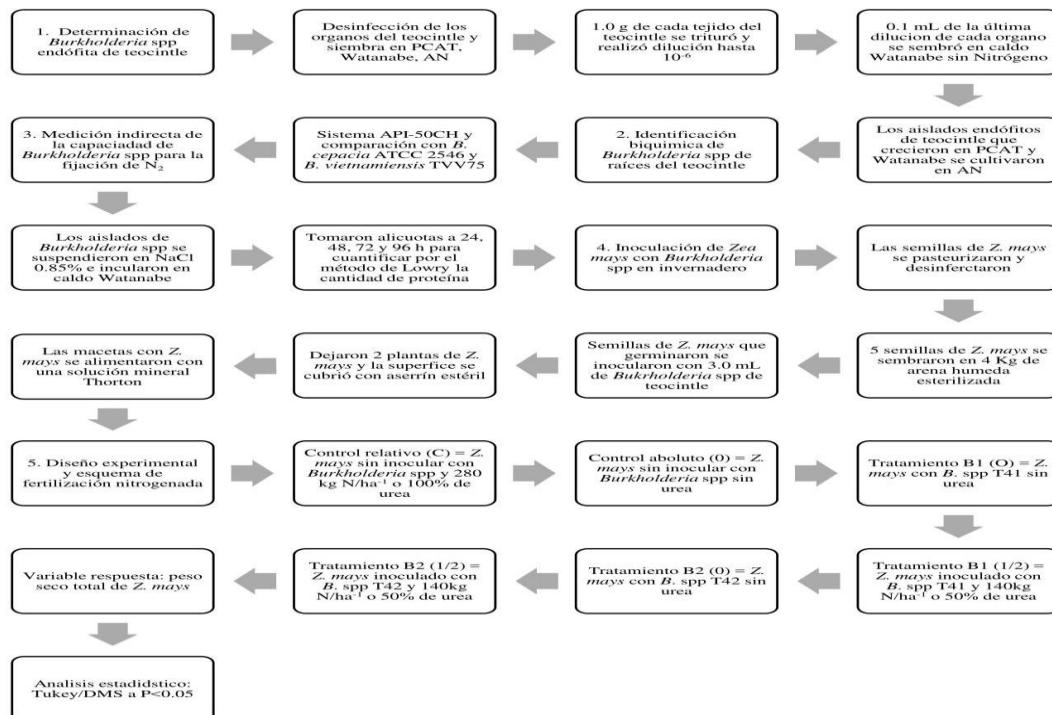
*Origen Zea mays var. mexicana (teocintle).* El teocintle se colectó de los municipios Santa Ana Maya y Álvaro Obregón de donde es nativo con suelos franco-arcillosos, pobres en materia orgánica, en N, en PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> soluble, de pH 6.8 ubicados en el noreste del estado de Michoacán a 35 km al noreste de Morelia, Mich, México. En la figura 1 se describe el esquema de aislamiento, respuesta de *Z. mays* a los aislados de BEPCV de teocintle e la identificación bioquímica.

*Determinación de la densidad de Burkholderia spp endófita de teocintle.* Los aislados de *Burkholderia* spp se detectaron en semilla, en las raíces y en el tallo-hojas, en la etapa 6, de la escala de Feekes ó de la extensión del tallo<sup>39</sup> y en la etapa 11.4 ó del llenado del grano, para ello los tejidos u órganos del teocintle se enjuagaron externamente con agua destilada y desinfectaron con un detergente comercial al 1.0% (p/v), en el caso de las raíces, se eliminaron

los residuos del suelo, en tanto que cada semilla, tejido u órgano de teocintle se desinfectó con NaClO (hipoclorito de sodio) al 3% (p/v) por 15 min, se enjuagaron 6 veces con agua estéril, luego se lavaron con tween 20 al 2% (v/v) por 5 min, posteriormente se enjuagaron 6 veces con agua estéril, finalmente

se desinfectaron con etanol al 70% por 5 min y enjuagaron 3 veces en agua estéril, la efectividad de la desinfección de las semillas y tejidos del teocintle, se comprobó en agar nutritivo (Bioxon) e incubación a 28-30 °C/24 h.

**Figura 1 Esquema del aislamiento de *Burkholderia* spp endófitas de *Zea mays* var *mexicana* (teocintle) en el crecimiento de *Zea mays* sin fertilizante nitrogenado**



Posteriormente de cada semilla o órgano de teocintle se pesó un gramo y trituró por separado en un mortero con NaCl al 0.85% (solución salina) estéril, se realizó una dilución desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$  para conocer la densidad de la población de *Burkholderia* spp endófita, de la última dilución se tomó 0.1 mL para sembrar en caldo Watanabe mineral sin N, empleado para la prueba indirecta de fijación biológica de N<sub>2</sub>, con la siguiente composición química: solución A (g/L): ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.43, MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O 1.30, NaMoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O 0.75, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2.8, CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O 0.026, CoSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.07; solución B (g/L): MnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 2.00, CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 2.00, FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.44, EDTA 0.04. Solución C (g/L): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 60, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

60, se mezclaron 50 mL de la solución B, 15 mL de la solución C 15 mL y 20 mL de la solución A por separado se agregaron (g/L): glucosa 5.0, sacarosa 4.5, manitol 3.5, almidón 4.0, el pH se ajustó a 6.8-7.0, el medio de cultivo esterilizó a 121 °C/15 min. Para el aislamiento de *Burkholderia* spp endófita se empleó el agar *Pseudomonas cepacia* ácido ázelaico triptamina (PCAT) (g/L): Mg SO<sub>4</sub> 0.1, ácido ázelaico 0.20, triptamina 0.2 g (disuelto en 2 mL de alcohol absoluto): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4, extracto de levadura 0.02, el pH se ajustó a 5.7, las cajas de PCAT con la BEPCV se incubaron a 28 °C/72 h, en tanto que las de Watanabe se incubaron por 28 °C/48 h, los aislados endófitos de teocintle que cre-

cieron, se resembraron en agar nutritivo para asegurar determinar la pureza.<sup>22</sup>

**Tabla 1 Comparación entre el perfil bioquímico de *Burkholderia* spp endófitas de *Zea mays* var *mexicana* y *Pseudomonas* de plantas domésticas y silvestres**

Prueba	<i>Burkholderia</i> sp	<i>Pseudomonas</i> sp
Gram	-	-
Movilidad	+	+
Oxidasa	+	+
Catalasa	+	+
Arginina desaminasa	-	+
Ureasa	+	-
Indol (Triptofanasa)	-	-
Producción de H <sub>2</sub> S	-	-
Rojo de metilo	+	+
Crec. sin N comb*.	+	+
Asimilación de:		
Ácido azelaico	+	-
Triptamina	+	-
Citrato de sodio	+	+
Fermentación de:		
Glucosa	-	-
Lactosa	-	-
Sacarosa	-	-
Manitol	-	-
Sensibilidad a polimixina	R	S

Reacción= (+)= positiva y (-)= negativa; (R)= resistente; (S)= sensible, \*Crec. sin N comb.= crecimiento en medio mineral sin nitrógeno.  
Cada prueba se realizó por triplicado.

**Tabla 2 Asimilación de diferentes fuentes de carbono orgánico por *Burkholderia* spp endófita de *Zea mays* var *mexicana* (teocintle o BET)**

		Fuentes de carbono												
		*	**	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Cepas de referencia	<i>B. cepacia</i> ATCC 25416	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
	<i>B. vietnamensis</i> TVV 75	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
BET	<i>B. spp</i> T41	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
	<i>B. spp</i> T42	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+

\*Acetato, D- $\alpha$ -alanina, succinato, 2 ceto-gluconato, celobiosa, D-arabinosa, D- arabinitol, D-fructuosa, D-glucosa, D-lisosa, D-manosa, D-tagatosa, dulcitol, D-xilosa, esculina, galactosa, glicerol, gluconato, inositol, D-arabinosa, D, fucosa, manitol, N-acetil glucosamina, ribosa, sacarosa, sorbitol, fueron asimilados. \*\* $\alpha$ -metil D-glucosida,  $\alpha$ -metil D-manosida, almidón,  $\beta$ -metil xilosa, ramnosa, melizitosa, melibiosa, maltosa, lactosa, erytrio, L-sorbosa, glucógeno, inulina. 1= $\beta$ -gentobiosa, 2=Adonitol, 3=Amigdalina, 4=Arabutina, 5=D-arabinol, 6=D-fucosa, 7=D-rafinosa, 8=Turanosa, 9=Inulina, 10=Salicilina, 11=glucógeno. Reacción observada: (+) = asimilado, (-) = no asimilado, BET= *Burkholderia* spp endófita de teocintle.

*Identificación bioquímica de Burkholderia* spp o BEPCV de raíces del teocintle. Los aislados de *Burkholderia* spp del teocintle se identificaron, mediante perfil bioquímico Tabla 1, como se describe en la literatura<sup>33</sup>, con el sistema API-50CH (BioMerieux, Francia), *Burkholderia* spp endófita del teocintle, se compararon con las cepas de referencia: *B. cepacia* ATCC 2546 y *B. vietnamensis* TVV75, donadas por el Dr. J. Balandreu y el Dr. Tran Van

Van, del Depto. de Ecología Microbiana de Suelos de la Universidad Claude Bernard, Lyon, Francia, además de estas pruebas bioquímicas en la Tabla 2 que se relacionan con este género, referente a la capacidad de utilizar diversas fuentes de carbono (C).

*Medición indirecta de la capacidad de Burkholderia spp para la fijación biológica de N<sub>2</sub>.* Los aislados de *Burkholderia* spp endófita de teocintle se suspendie-

ron en NaCl 0.85% para inocular matraces erlenmeyer de 500 mL con 250 mL de caldo Watanabe, estos matraces se incubaron de 28-30 °C, después se tomaron alícuotas a intervalos de 24, 48, 72 y 96 h, para que por el método de Lowry cuantificar la cantidad de proteína en el medio de cultivo producto indirecto del crecimiento de *Burkholderia* spp al fijar N<sub>2</sub>.<sup>20</sup>

*Inoculación de Z. mays con Burkholderia spp en invernadero.* En este ensayo se usaron semillas de *Z. mays* "raza jala", donadas por el Laboratorio de Química de Productos Naturales perteneciente a la Facultad de Químico-Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Las semillas se pasteurizaron sumergidas en agua a 70 °C/5 min, para eliminar las bacterias endófitas que contienen según lo reporta en la literatura<sup>27-29</sup>, luego las semillas se colocaron en hielo por 5 min, se desinfectaron acorde con el procedimiento señalado en el inciso b), para aislar las bacterias endófitas de tejidos y órganos vegetales de teocintle.

Para el experimento del efecto de *Burkholderia* spp en *Z. mays* se sembraron 5 semillas por maceta de plástico con capacidad de 4 kg, en arena húmeda esterilizada a 121 °C/60min por 3 días, cuando las semillas germinaron se inocularon 3 mL de *Burkholderia* spp de teocintle a una densidad de 1x10<sup>3</sup> log UFC/semilla, después de germinar se dejaron 2 plantas de *Z. mays* por maceta, la superficie se cubrió con aserrín esterilizado a 121 °C/2 h, las macetas de *Z. mays* se mantuvieron en invernadero, se alimentaron 3 veces por semana con la solución mineral Thorton para plantas, esterilizada a 121 °C/15 min, cuya composición química fue (g/L): urea 10.0 (dosis reducida al 50%), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0, MgSO<sub>4</sub> 1.0, NaCl 0.1, FeSO<sub>4</sub> 0.1 y 10.0 mL solución de oligoelementos (g/L): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2.86, ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.22, MgCl<sub>2</sub> 7H<sub>2</sub>O 1.81, K<sub>2</sub>MnO<sub>4</sub> 0.09 y pH 6.5-6.8.<sup>40</sup>

*Diseño experimental y esquema de fertilización nitrogenada en Z. mays.* En este ensayo *Z. mays* se inoculo con *Burkholderia* spp (aisladas como BEPCV de teocintle) con los siguientes tratamientos: control relativo (C) = *Z. mays* sin inocular con 280 Kg N/ha<sup>-1</sup> o la dosis 100% de FENI como urea recomendada para la región, control absoluto (0) = *Z. mays* sin inocular con *Burkholderia* spp y sin FENI; tratamiento B1 (0) = *Z. mays* con *Burkholderia* spp T41, sin FENI; tratamiento B1 (1/2) = *Z. mays* inoculado con *Burkholderia* spp T41 y 50% de la dosis del FENI ó 140 kg/ha<sup>-1</sup>, tratamiento B2 (0) = *Z. mays* con *Burkholderia* spp T42, sin FENI; tratamiento B2 (1/2) = *Z. mays* inoculado con *Burkholderia* spp T42 y 50% del FENI. El diseño se estableció con 20 repeticiones por tratamiento, la distribución de *Z. mays* en el invernadero fue un diseño de bloques al azar, se realizaron 2 muestreos: el primero al amacollamiento según la escala Fekkes<sup>39</sup>, el segundo a la extensión de tallo, en cada muestreo se separaron las raíces y el tallo para determinar su peso seco a 80 °C/24h.

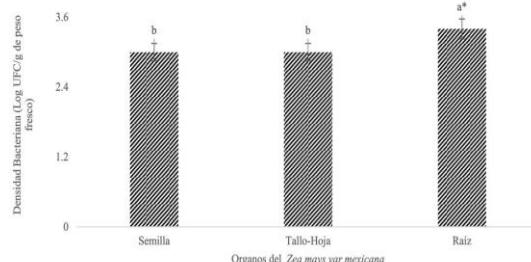
*Análisis estadístico.* Los resultados se sometieron a la prueba de Tukey, con base en un diseño de 6 tratamientos y 20 repeticiones, para evaluar la respuesta de *Z. mays* a *Burkholderia* spp se determinó el peso seco, mientras que las diferencias en la respuesta de *Z. mays* por tratamiento se analizaron por comparación de medias, mediante la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) a un nivel de significación de P<0.05. Los cálculos se realizaron con el programa para computadora Statgrat versión 5.0<sup>49</sup>

## Resultados

En la figura 1a, se muestra la densidad de la población endófita de *Burkholderia* spp o BEPCV de las

raíces del teocintle, donde se detectó en un orden de magnitud de 3.4 log UFC/GPF (gramo de peso fresco), este valor numérico fue estadísticamente diferente comparado con los 3.0 log UFC/GPF de *Burkholderia* spp en el tallo-hoja y en semilla del teocintle.

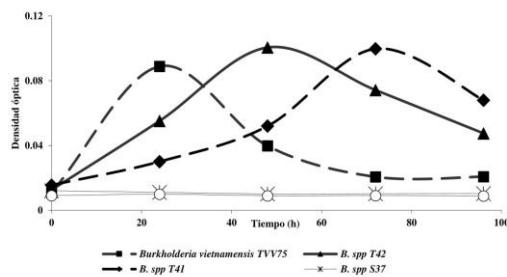
Figura 1a Densidad de la población endófita de *Burkholderia* spp en semillas, tallo-hoja y raíz de *Zea mays* var *mexicana* (teocintle)



Los valores son el promedio de 100.0 g de semillas, y 20 plantas. Letras distintas indican diferencia estadística (DMS P<0.05) según Tukey. 1 g = semilla, tallo y raíz.

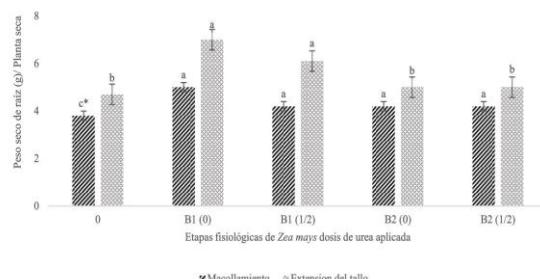
En la figura 2, se presenta el crecimiento de *Burkholderia* spp T41, T42 y S37 o BEPCV de teocintle que se aislaron en agar Watanabe sin ninguna forma de N combinado, en donde se registró que *B. vietnamensis* TVV75 creció en 24 h, mientras que *Burkholderia* sp T41 lo hizo en 48 h y *Burkholderia* sp T42 en 72 h, comparado con las cepas de referencia: *B. cepacia* ATCC 25416, *B. vietnamensis* TVV 75.

Figura 2 Crecimiento de *Burkholderia* spp de *Zea mays* var *mexicana* y las cepas de referencia de *Burkholderia* spp en caldo Watanabe como medida indirecta de la fijación biológica del N<sub>2</sub>



Todos los valores son el promedio de 20 repeticiones. CV 15%

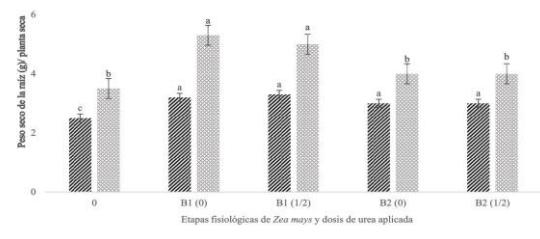
Figura 3 Efecto de *Burkholderia* spp endófita de *Zea mays* var *mexicana* sobre el peso seco de la raíz de *Zea mays* con y sin urea en invernadero



0 = *Zea mays* sin inocular con *Burkholderia* spp irrigado solo con agua. B1 = *Z. mays* inoculado con *Burkholderia* spp T41, B2 = *Z. mays* inoculado con *B. spp* T42. (1) = dosis de urea 280 Kg/h<sup>-1</sup>, (1/2) = dosis de urea 140 Kg/h<sup>-1</sup>, (0), sin urea. La medida corresponde a 20 repeticiones. \*Letras distintas indican diferencia estadística (DMS P<0.05) según Tukey.

En la figura 3, se muestra la respuesta *Z. mays* a *Burkholderia* spp T41 sin FENI, en donde se registró un aumento de un 47% en el peso seco radical (PSR) al amacollamiento, comparada con el PSR del *Z. mays* sin inocular con *Burkholderia* spp alimentada con el 50% del FENI (urea 140 kg/ha<sup>-1</sup>) y de *Z. mays* con el FENI al 100% (urea 280 kg/ha<sup>-1</sup>), referido como el control relativo. En tanto que *Z. mays* respondió positivamente a *Burkholderia* sp T42 sin FENI, ya que registró un incremento del 11% el peso seco del tallo (PST), comparado con *Z. mays* alimentado con el FENI al 50% (140 kg/ha<sup>-1</sup> de urea) que alcanzo 14% del PST, ambos valores numéricos fueron estadísticamente similares a *Z. mays* sin inocular y alimentado con el FENI al 100% (280 kg/ha<sup>-1</sup> de urea).

Figura 4 Efecto de inoculación de *Burkholderia* spp endófitas de las raíces de *Zea mays* var *mexicana* (teocintle), sobre el peso seco del tallo de *Zea mays* con y sin urea en invernadero



0 = *Zea mays* sin inocular con *Burkholderia* spp irrigado solo con agua. B1 = *Z. mays* inoculado con *Burkholderia* spp T41, B2 = *Z. mays* inoculado con *B. spp* T42. (1) = dosis de urea 280 Kg/h<sup>-1</sup>, (1/2) = dosis de urea 140 Kg/h<sup>-1</sup>, (0), sin urea. La medida corresponde a 20 repeticiones. \*Letras distintas indican diferencia estadística (DMS P<0.05) según Tukey.

En la figura 4, se muestra la respuesta positiva de *Z. mays* a *Burkholderia* sp T41 (BEPCV del sin FENI, donde registró un 57% del PST, comparado con el *Z. mays* sin inocular alimentado con el FENI al 50%

(140 kg/ha<sup>-1</sup> de urea) que alcanzo un 39% del PST, valor numérico sin diferencia estadística al registrado en *Z. mays*, sin inocular con el FENI al 100% (280 kg/ha<sup>-1</sup> de urea). En tanto que *Z. mays* tuvo un respuesta benéfica a *Burkholderia* sp T42 sin FENI con un aumento del 18% del PST, valor numérico sin diferencia estadística comparado con el PST de *Z. mays* con el FENI al 50% (140 kg/ha de urea), sin diferencia estadística con el PST del *Z. mays* no inoculado con las BEPCV, alimentado con el FENI al 100% (280 kg/ha<sup>-1</sup> de urea).

En la tabla 1, se muestra el perfil bioquímico de los aislados de BEPCV del teocintle, basado en la literatura que reporta que *Burkholderia* spp este género se describe como un bacilo Gram negativo, móvil, catalasa y oxidasa positivo, no produce ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S), ni triptofanasa, que usa la sintetiza citocromo oxidasa, que tiene un patrón oxidativo en la utilización de azúcares, como fuentes de C y energía, pero no libera ácido de glucosa, pero sí como el citrato de sodio, algunas especies tienen la capacidad genética de fijar N<sub>2</sub>, por lo que crecen medio de cultivo mineral sin ninguna forma de N combinado inorgánico u orgánico. En la Tabla 1 también se presentan las diferencias bioquímicas básicas entre *Burkholderia* spp de teocintle y el género *Pseudomonas* spp<sup>22,41</sup>, con patrones bioquímicos que apoyan la estrecha relación genética entre ambos géneros, y las diferencias que señalan como 2 géneros distintos, en consecuencia los aislados BEPCV de teocintle fueron clasificados como miembros de especies de *Burkholderia*.<sup>22,34,38</sup>

La Tabla 2, se muestra el patrón de asimilación de 50 carbohidratos de los BEPOCV de teocintle denominadas: T421 y T42 en comparación con las cepas de referencia *B. cepacia* ATCC 25416 y *B. vietnamiensis* TVV 75. El perfil de asimilación de los aislados de BEPCV fue: acetato, D- $\alpha$ -alanina, succinato, 2-ceto-gluconato, celobiosa, D-arabinosa,

D-arabitol, D-fructuosa, D-glucosa, D-lisosa, D-manosa, D-tagatosa, D-dulcitol, D-xilosa, esculina, galactosa, glicerol, gluconato, inositol, D-arabinosa, D-fucosa, manitol, N-acetil glucosamina, ribosa, sacarosa, sorbitol, pero no  $\alpha$ -metil D-glucósido,  $\alpha$ -metil D-manosida, almidón,  $\beta$ -metil xilosa, ramnosa, melicitosa, melibiosa, maltosa, lactosa, eryritol, L-sorbosa. En tanto que tanto *B. vietnamiensis* TVV75 como *Burkholderia* sp T42, usaron  $\beta$ -gentobiosasola y D-fucosa, mientras que *B. cepacia* y *Burkholderia* sp T41 y T42 utilizaron, arabutina, en contraste con *B. cepacia* que uso D-arabitol: mientras que *B. vietnamiensis* fue capaz de usar furanosa, contrario *Burkholderia* sp T41 que utilizaron salicilina, diferente a *Burkholderia* sp T41 y T42 aislados que usaron glucógeno e inulina como fuente de C y energía. Las diferencias en el patrón bioquímico de utilización o asimilación de azúcares y ácidos grasos podrían emplearse en el diseño de medios de cultivo selectivos y diferenciales para cada una de las especies de *Burkholderia* tanto endófitos de plantas como los de los ambientes en la naturaleza, pues este género es cosmopolita. Las BEPCV relacionados con *Burkholderia* spp de teocintle T41 y T42, mostraron un patrón de asimilación de azúcares y sus derivados, similar al reportado para otras especies de *Burkholderia*<sup>22</sup>, en especial *B. vietnamiensis*.<sup>34</sup>

## Discusión

En la figura 1a, se muestra que *Burkholderia* sp es una endófita del teocintle, distribuida a través del sistema de conducción en todos órganos que incluye la semilla, en especial en las raíces, como se reporta para otros géneros y especies de endófitos en una amplia variedad de vegetales domésticos y silvestres diferentes al teocintle<sup>30,31</sup>, lo que confirma los seña-

lado en la literatura sobre *Burkholderia* spp distribuida en plantas de cualquier ambiente.<sup>9,16,18,20,26</sup> El crecimiento *B. vietnamensis* TVV 75 y de *Burkholderia* spp T41 y T42 se presenta en figura 2 en caldo Watanabe, lo que demuestra que son capaces de fijar N<sub>2</sub>.<sup>9,11,42</sup> Mientras que la cepa de referencia *B. cepacia* ATCC 25416 al igual que *Burkholderia* sp S37 aunque es una BEPCV de teocintle no fijan N<sub>2</sub> en concordancia con la literatura que reporta que especies relacionadas con *B. cepacia* pueden sintetizar SUPOCEVE aunque no fijen N<sub>2</sub>,<sup>22</sup> a diferencia *B. vietnamensis* TVV75 una endófita que fija N<sub>2</sub> libremente como en asociación con *O. sativa*.<sup>9,34,35,43</sup> Los aislados de *Burkholderia* sp T41 y T42 revelaron un perfil bioquímico diferente *B. vietnamensis*, lo que apoya se trata de otra especie capaz de fijar N<sub>2</sub>.

En la figura 3 se muestra la respuesta positiva de *Z. mays* a *Burkholderia* spp a la dosis 50 % de FENI (140 kg/ha<sup>-1</sup> de urea), fue debido a que cuando colonizó la raíz de *Z. mays*, transformó los exudados radicales en SUPOCEVE, lo que indujo una mayor proliferación de los pelos radiculares que mejoraron y optimizaron la absorción radical del FENI a pesar de reducir la dosis hasta un 50%.<sup>11,16</sup> Mientras que la respuesta de *Z. mays* a *Burkholderia* sin FENI, se explica con base a que tiene la capacidad de fijar N<sub>2</sub>, actividad dependiente de la concentración del FENI disponible<sup>5,16</sup>, la fijación de N<sub>2</sub> una propiedad genética que se ha reportado en *B. vietnamensis*, pero los endófitos son relativamente menos conocidos que los géneros de BPCV fijadoras de N<sub>2</sub> de la rizosfera,<sup>9,11,28</sup> de gramíneas y que estimulan el crecimiento vegetal a dosis reguladas del FENI.<sup>19,36,43,44</sup> En la figura 4 se muestra la respuesta de *Z. mays* a *Burkholderia* spp sin FENI, y que apoya que este género fijar N<sub>2</sub> en interior de las raíces de *Z. mays*<sup>9</sup> de forma análoga a lo reportado en *O. sativa* inocu-

lado con *B. vietnamensis* sin FENI.<sup>16,28</sup> La respuesta positiva de *Z. mays* a *Burkholderia* spp fue similar a lo reportado en la literatura<sup>20</sup> con *S. officinarum* inoculado con *Azotobacter diazotrophicus* que aumento en un 50% el contenido de N, sin FENI mediante fijación de N<sub>2</sub> y la síntesis de SUPOCEVE.<sup>42,43,45,46</sup> Respuesta similar a la *S. officinarum* sin inocular alimentada con el FENI al 100%. La respuesta favorable de *Z. mays* a *Burkholderia* spp, indica que es probablemente por la capacidad de sintetizar la nitrogenasa para fijar el N<sub>2</sub>, cuya actividad que no se inhibir por la concentración del FENI en el suelo o por el aplicado, contrario a lo señalado en la literatura sobre *S. officinarum* y *A. diazotrophicus* en que a dosis moderadas de FENI, se inhibió la actividad de fijación biológica de N<sub>2</sub>, por un efecto feedback, dependiente de la concentración del N mineral en el suelo.<sup>29,47,48</sup>

En la relación a la identificación de los aislados de BEPCV de teocintle el género y especies de *Burkholderia* fueron las principalmente reconocidas, el perfil bioquímico sugiere que algunos están asociados genéticamente con *B. vietnamensis*, primero por la capacidad de fijar N<sub>2</sub> y porque también sintetizan SUPOCEVE algunas de las modifican el patrón de crecimiento del sistema radical de *Z. mays*, por compuestos volátiles diferentes a las fitohormonas conocidas, y que actualmente reporta que son parte de los mecanismos de promoción para mejorar el crecimiento vegetal a dosis reguladas de FENI.<sup>43,45,46</sup> Mientras que otra explicación al efecto positivo de *Burkholderia* spp (BEPCV), en *Z. mays* fue dependiente de la conversión de compuestos orgánicos, derivados de metabolismo vegetal durante la fotosíntesis en SUPOCEVE, este clase de fitohormonas, tiene que ver con el género y especies de BPCV o BEPCV, así como de la especie vegetal específica con la que se asocian, tanto a nivel endó-

fita o radical y que es regulado por la concentración de FENI o N disponible en el suelo.<sup>18,23,44,45,48</sup>

Con base en lo anterior se concluye que en los órganos o tejidos del teocintle: raíces, tallo-hojas y semillas en ese orden de densidad existe *Burkholderia* spp. Mientras que estos aislados de BEPCV fueron benéficas para el crecimiento de *Z. mays*, en función de la concentración del FENI aplicado, aunque también se detectó que algunos aislados de *Burkholderia* fijan N<sub>2</sub> en ausencia de FENI sin N disponible. El perfil bioquímico de los aislados de BEPCV de teocintle, apoya que algunas de estas especies están relacionadas con *B. vietnamiensis* por la capacidad de fijar N<sub>2</sub>, aunque también porque sintetizan SUPCOCEVE, ambos mecanismos hacen posible que este grupo de BEPCV sean consideradas útiles en la producción sustentable de *Z. mays*.

## Conflictos de intereses

Los participantes en esta investigación declaramos que no existe ningún problema en la relación con la información aquí divulgada con las instituciones participantes así como quienes la financiaron total o parcialmente.

## Agradecimientos

Al Proyecto 2.7 (2019) de la CIC-UMSNH, a BIONUTRA S A de CV Maravatio, Mich, México, a Beatriz Noriega-Gamboa por la escritura.

## Aspectos éticos

La aprobación de la investigación por el Comité de Ética, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo - México, siguió las pautas establecidas

para publicaciones en la divulgación de la ciencia generada.

## Literatura citada

1. Eubanks MW. The mysterious origin of maize. *Econ Bot* 2001;55(4):492-514.
2. Ferrera Cerrato R. Efecto de rizosfera. En: Ferreira Cerrato R, Pérez Moreno J, editores. Agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable. Montecillos, Estado de México: Colegio de postgraduados en Ciencias Agrícolas, 1995. p. 36-50.
3. Cárdenas Navarro R, Sánchez Yáñez JM, Farías Rodríguez R, Peña Cabriales JJ. Los aportes de nitrógeno en la agricultura. *Rev Chapingo Ser Hortic* 2004;10(2):173-8. <http://dx.doi.org/10.5154/rchsh.2002.07.039>
4. Armenta Bojórquez AD, García Gutiérrez C, Camacho Báez JR Apodaca Sánchez MA, Gerardo Montaya L, Nava Perez E. Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximbal* 2010;6(1):51-6. DOI: <http://www.dx.doi.org/10.35197/rx.06.01.2010.07.aa>
5. Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Ptacek D, Vanderleyden J, Dutto P, et al. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust J Plant Physiol* 2001; 28(9):871-9. DOI: <https://dx.doi.org/10.1071/PP01074>
6. Askary M, Mostajeran A, Amooaghaei R, Mostajeran M. Influence of the co-inoculation *Azospirillum barasilense* and *Rhizobium melilotus* plus 2,4-D on grain yield and N,P,K content of *Triticum aestivum* (cv Baccros and Mahdavi) *Am Eurasian J Agric Environ Sci* 2009;5(3):296-307.
7. Bashan Y, Levanony H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a

- challenge for agriculture. *Can J Microbiol* 1990; 36(9):591-608. DOI: <https://dx.doi.org/10.1139/m90-105>
8. Bashan Y, Holguin G, Ferrera Cerrato R. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. *Terra* 1996;14(2):159-92.
9. Franche C, Lindstrom K, Elmerich C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil* 2009;321(1-2):35-59. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/s11104-008-9833-8>
10. Dos Reis Junior FB, Massena Reis V, Urquiaga S, Döbereiner J. Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). *Plant Soil* 2000;219(1-3):153-9. <https://dx.doi.org/10.1023/A:1004732500983>
11. Avis TJ, Gravel V, Antoun H, Tweddell RJ. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biol Biochem* 2008;40(7):1733-40. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.02.013>
12. Wilkes HG. Maiz and its wild relatives. *Science* 1972;177(4054):1071-7.
13. Wilkes HG. Hybridization of maize and teosinte in Mexico and Guatemala and improvement of maize. *Econ Bot* 1997;31:254-93. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02866877>
14. Galinat WC. A reconstruction of a possible role of crucial observations leading to a rapid domestic transformation of wild teosinte into the first maize. *Econ Bot* 2001;55(4):571-4.
15. Wilkes HG. Teosinte: the closest relative of maize revised. *Maydica* 1985;30:209-23.
16. Ahemad M, Kibret M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J King Saud Univ Sci* 2014;26(1):1-20. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
17. Sánchez G JJ, Ordaz SL. El teocintle en México. Distribución y situación actual de las poblaciones. Systematic and ecogeographic studies on crop gene pools: 2. IBPGR, Rome; 1987.
18. Nejad P, Johnson PA. Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. *Biol Control* 2000;18(3):208-15. DOI: <https://dx.doi.org/10.1006/bcon.2000.0837>
19. Sturz AV, Nowak J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Appl Soil Ecol* 2000;15(2):183-90. DOI: [https://dx.doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00094-9](https://dx.doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00094-9)
20. Sevilla M, De Oliveira A, de Baldani I, Kennedy C. Contributions of the endophyte *Acetobacter diazotrophicus* to sugarcane nutrition: a preliminary study. *Symbiosis* 1998;25:181-91.
21. Magalhães Cruz L, Maltempi de Souza E, Baler Weber O, Ivo Baldani J, Döbereiner J, de Oliveira Pedrosa F. 16S Ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril). *Appl Environ Microbiol* 2001;67(5):2375-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.67.5.2375-2379.2001>
22. Castellanos Morales V, Villegas J, Cárdenas Navarro R, Farías Rodríguez R, Sánchez Yáñez JM. Diversity of *Burkholderia cepacia* associated to teocinte. *Phyton* 2005;54:27-38.
23. Gardner JM, Feldman AW, Zablotowicz RM. Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of Florida citrus trees. *Appl Environ Microbiol* 1982;43(6):1335-42.
24. McInroy JA, Kloepper JW. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn.

- Plant Soil 1995a;173(2):337-42. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/BF00011472>
25. McInroy JA, Kloepper JW. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. Can J Microbiol 1995b;41(10):895-901. DOI: <https://dx.doi.org/10.1139/m95-123>
26. Sturz AV. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. Plant Soil 1995;75(2):257-63. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00011362>
27. Hallmann J, Kloepper JW, Rodríguez Kábana R, Sikora RA. Endophytic rizobacteria as antagonists of *Meloidogyne incognita* on cucumber. Phytopatology 1997a;85:1136.
28. Hallmann J, Quadt Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW. Bacterial endophytes in agricultural crops. Can J Microbiol 1997b;43(10): 895-914. DOI: <https://dx.doi.org/10.1139/m97-131>
29. Hallmann J, Kloepper JW, Rodriguez Kábana R. (1997c). Application of the Scholander pressure bomb to studies on endophytic bacteria of plants. Can J Microbiol 1997c;43(5):411-6. DOI: <https://dx.doi.org/10.1139/m97-058>
30. Sharrock KR, Parkes SL, Jack HK, Rees George J, Hawthorne BT. Involvement of bacterial endophytes in storage rots of buttercup squash (*Cucurbita maxima* D. hybrid 'Delica'). N Z J Crop Hortic Sci 1991;19(2):157-65. DOI: <https://dx.doi.org/10.1080/01140671.1991.10421794>
31. Benhamou N, Kloepper JW, Quadt Hallman A, Tuzun S. Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. Plant Physiol 1996; 112 (3):919-29. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.112.3.919>
32. Weber OB, Baldani VLD, Teixeira KRS, Kirchhof G, Baldani JI, Dobereiner J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. Plant Soil 1999;210 (1):103-13. DOI: <https://dx.doi.org/10.1023/A:1004623523179>
33. Mattos KA, Jones C, Heise N, Previato JO, Mendonça Previato L. Structure of an acidic exopolysaccharide produced by the diazotrophic endophytic bacterium *Burkholderia brasiliensis*. Eur J Biochem 2001;268(11):3174-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02196.x>
34. Gillis M, Van Van T, Bardin R, Goor M, Hebbar P, Willems A, Fernandez MP. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. Int J Syst Evol Microbiol 1995;45(2):274-89. DOI: [https://dx.doi.org/10.1099/00207713-45-2-274](http://dx.doi.org/10.1099/00207713-45-2-274)
35. Trân Van V, Berge O, Ngô Kê S, Balandreau J, Heulin T. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. Plant Soil 2000;218(1-2):273-84. DOI: <https://dx.doi.org/10.1023/A:1014986916913>
36. Minerdi D, Fani R, Gallo R, Boarino A, Bonfante P. Nitrogen fixation genes in an endosymbiotic *Burkholderia* strain. Appl Environ Microbiol 2001;67(2):725-32. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.67.2.725-732.2001>
37. Mundt JO, Hinkle NF. Bacteria within ovules and seeds. Appl Environ Microbiol 1976;32:694-8.
38. Baldani JI, Caruso L, Baldani VLD, Goi SR, Döbereiner J. Recent advances in BNF with non-legume plants. Soil Biol Biochem 1997;29(5-6): 911-92. [https://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00218-0](https://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00218-0)
39. Large EC. Growth stages in cereals illustration of the Feekes scale. Plant Pathol 1954;3(4):128-9. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1954.tb00716.x>

40. García-González MM, Peña C JJ, Moreno MP, Sánchez Yáñez JM. Inoculación de maíz con bacterias fijadoras de N<sub>2</sub>. *Terra latinoam* 1995;13:71-80.
41. Valdivia-Urdiales B, Sánchez-Yáñez JM, Peña Cervantes E, Fernández Brondo JM. Efecto de la inoculación con *Glomus* spp. y *Pseudomonas putida* en Trigo. *Rev Latinoam Microbiol* 1999;41 (4): 231-38.
42. Ortiz Castro R, Valencia Cantero E, López Bucio J. The beneficial role of rhizosphere microorganisms in plant health and productivity: improving root development and nutrient acquisition. *Acta Hort* 2013;1009:241-50. DOI: <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.1009.29>
43. Hernández A, Rives N, Caballero A, Hernández AN, Heydrich M. Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo de maíz en la producción de metabolitos del tipo AIA, sideróforos y ácido salicílico. *Re Colomb Biotecnol* 2004;6(1):6-13.
44. Bottini R, Cassán F, Piccoli P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004;65(5):497-503. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-004-1696-1>
45. Gutiérrez Luna FM, López Bucio J, Altamirano Hernández J, Valencia Cantero E, Reyes de la Cruz HR, Macías Rodríguez L. Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis* 2010;51(1):75-83. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/s13199-010-0066-2>
46. Orozco Mosqueda MC, Velázquez Becerra C, Macías Rodríguez LI, Santoyo G, Flores Cortez I, Alfaro Cuevas R, et al. *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces acquisition in *Mendicago truncatula* (Strategy I plant) in vitro via dimethylhexadecylamine emission. *Plant Soil* 2013;362(1-2): 51-66. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1263-y>
47. Sturz AV, Christie BR, Nowak J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Crit Rev Plant Sci* 2000;19(1):1-30. DOI: <https://dx.doi.org/10.1080/07352680091139169>
48. Berendsen RL, Pieterse CM, Bakker PA. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci* 2012;17(8):487-6. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>
49. Walpole, E R, Meyers R and Meyers LS. Probabilidad y Estadística para Ingeniería y Ciencias. Ed. Pearson 8ed. Mexico.