

UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO  
FACULTAD DE AGRICULTURA Y ZOOTECNIA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



“Rendimiento del maíz forrajero y propiedades químicas en suelo rizosférico mediante la aplicación de RPCV (rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal)”

TESIS DE MAESTRÍA

PRISCILLA YAMILHET MONTES ORONA

VENECIA, DGO.

ENERO, 2023

UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO  
FACULTAD DE AGRICULTURA Y ZOOTECNIA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



“Rendimiento del maíz forrajero y propiedades químicas en suelo rizosférico mediante la aplicación de RPCV (rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal)”

TESIS DE MAESTRÍA

PRISCILLA YAMILHET MONTES ORONA

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN AGRICULTURA ORGÁNICA SUSTENTABLE

VENECIA, DGO.

ENERO, 2023

**UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO**

**FACULTAD DE AGRICULTURA Y ZOOTECNIA**

**DIVISIÓN ESTUDIOS DE POSGRADO**

ENERO, 2023

La tesis "RENDIMIENTO DEL MAÍZ FORRAJERO Y PROPIEDADES QUÍMICAS EN SUELO RIZOSFERICO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE RPCV (rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal)" presentada por: **PRISCILLA YAMILHET MONTES ORONA** para obtener el grado académico de: **MAESTRO EN CIENCIAS EN AGRICULTURA ORGÁNICA SUSTENTABLE** ha sido aprobada por el Comité Particular Asesor de Tesis.

**El Comité Particular Asesor de Tesis**

**Director**



Ignacio Orona Castillo Dr.

**Asesor**



Miguel Ángel Gallegos Robles Dr.

**Asesor**



Uriel González Salas Dr.

**UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO**  
**FACULTAD DE AGRICULTURA Y ZOOTECNIA**  
**DIVISIÓN ESTUDIOS DE POSGRADO**

ENERO, 2023

La tesis “**RENDIMIENTO DEL MAÍZ FORRAJERO Y PROPIEDADES QUÍMICAS EN SUELO RIZOSFERICO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE RPCV (rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal)**” presentada por: **PRISCILLA YAMILHET MONTES ORONA** para obtener el grado académico de: **MAESTRO EN CIENCIAS EN AGRICULTURA ORGÁNICA SUSTENTABLE** ha sido aprobada por el Comité Particular Revisor de Tesis.

**El Comité Particular Revisor de Tesis**

**Director**



Ignacio Orona Castillo Dr.

**Asesor**



Miguel Ángel Gallegos Robles Dr.

**Asesor**



Uriel González Salas Dr.

## **DEDICATORIAS**

### **A Dios**

Por sus obras en mi vida, su bondad y ser luz para guiar mi camino

### **A mis padres.**

#### **Yazmín Orona y Héctor Montes.**

Por cada minuto sacrificado por mi bienestar, por su incansable dedicación en mi formación personal, pero sobre todo por su amor incondicional. Mi eterna admiración y respeto.

### **A mis hermanos**

#### **Héctor y Estrella**

Por formar parte de este ajetreado camino, ser sostén, apoyo y compañía en cada momento de mi vida.

### **A mi novio**

#### **Jared Ceniceros**

Por ser motivación, dirección e impulso en mi formación, por su apoyo incondicional, su paciencia y su gran amor.

## **AGRADECIMIENTOS**

A **Dios** por permitirme culminar una etapa académica más, por cuidarme y mostrarme el camino adecuado.

A **mis padres** por su apoyo y amor incondicional, por suplir cada una de mis necesidades, ayudarme e impulsarme a lograr todo lo que me proponga. A mis hermanos por acompañarme en cada momento

A **mi novio** por motivarme a seguir creciendo profesionalmente, por todo su apoyo, amor y paciencia.

A **la División de Posgrados de FAZ-UJED**, por permitirme formar parte de su institución y encaminarme en todo el proceso.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme los recursos para poder realizar este trabajo de investigación.

Agradezco al **Dr. Ignacio Orona Castillo** por recibirme, apoyarme y permitirme trabajar con él.

Al **Dr. Miguel Ángel Gallegos Robles** por estar siempre al pendiente, apoyarme y darles solución y seguimiento a mis dudas

Al **Dr. Uriel González Salas** por integrarme a su equipo de trabajo desde que ingrese, por su paciencia y gran virtud de enseñar, por su gran ayuda a lo largo de este proyecto.

A mis **MAESTROS y ASESORES** por compartir sus conocimientos conmigo, con la valiosa intención de formarme mejor profesionalmente.

A **mis compañeras** por brindarme su amistad a lo largo de este trayecto.

## CONTENIDO

DEDICATORIAS .....	i
AGRADECIMIENTOS .....	ii
ÍNDICE DE CUADROS .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
RESUMEN .....	viii
SUMMARY .....	x
I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. OBJETIVO GENERAL .....	4
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	4
1.3. HIPÓTESIS NULA .....	4
1.4. HIPÓTESIS ALTERNA .....	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	5
2.1. Importancia nutricional y económica .....	5
2.2. Condiciones climatológicas óptimas para el cultivo .....	5
2.3. Riego subsuperficial (RGS) con cintilla .....	6
2.4. Requerimientos del cultivo .....	7
2.5. Fertilización del maíz .....	8
2.6. Requerimientos edáficos del cultivo de maíz forrajero .....	8
2.6.1. Subsoleo .....	8
2.6.2. Barbecho .....	9
2.6.3. Rastreo .....	9
2.7. El suelo .....	9
2.7.1. Calidad del suelo .....	10
2.8. Degradación química del suelo .....	11
2.9. La rizósfera .....	11
2.10. Biofertilizante .....	13
2.11. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) .....	13
2.11.1. Género <i>Azospirillum brasilense</i> .....	14
2.11.2. Género <i>Bacillus</i> .....	15

2.11.2.1. Principales especies presentes en el suelo.....	16
2.11.2.2. Mecanismos de acción del género <i>bacillus</i> .....	16
2.11.2.2.1. Reguladores del crecimiento vegetal.....	17
2.11.2.2.2. Solubilización de fosfatos.....	17
2.11.2.2.3. Fijación de nitrógeno.....	17
2.12. Colonización de la raíz y distribución de las BPCV en la rizósfera....	18
2.13. Competencia de bacterias inoculadas con nativas del suelo .....	18
2.14. Gen 16S .....	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1. Localización geográfica .....	21
3.2. Localización del sitio experimental .....	21
3.3. Preparación del terreno .....	21
3.4. Diseño experimental .....	22
3.5. Riego .....	23
3.6. Siembra de cultivo .....	23
3.7. Material genético .....	23
3.8. Inoculación de las PGPR en las semillas.....	24
3.9. Cosecha.....	24
3.10. Variables agronómicas a evaluar .....	24
3.10.1. Altura de la planta .....	24
3.10.2. Diámetro del tallo .....	25
3.10.3. Volumen de raíz.....	25
3.10.4. Peso fresco y seco de la planta (g).....	25
3.11. Recolección de suelo rizosférico .....	26
3.12. Propiedades químicas del suelo a evaluar .....	26
3.12.1. Materia orgánica .....	26
3.12.2. Conductividad eléctrica .....	26
3.12.3. pH .....	27

3.12.4.	Nitrógeno mineral.....	27
3.12.5.	Fósforo.....	27
3.13.	Aislamiento y selección de colonias del género <i>Bacillus</i> sp. ....	27
3.14.	Aislamiento y selección de cepas de <i>Bacillus</i> fijadoras de nitrógeno	28
3.15.	Extracción de DNA para la identificación de cepas aplicadas .....	29
3.16.	Identificación molecular por secuenciación del gen 16S rDNA.....	29
IV.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	31
4.1.	Variables fenológicas.....	31
4.1.1.	Diámetro del tallo .....	33
4.1.2.	Rendimiento verde .....	34
4.1.3.	Rendimiento Seco .....	35
4.1.4.	Volumen de raíz y peso seco de raíz .....	36
4.2.	Análisis inicial de suelo .....	36
4.3.	Análisis Final de suelo .....	37
4.4.	Amplificación de las muestras .....	38
4.5.	Secuenciación del gen 16S rDNA.....	42
V.	CONCLUSIONES.....	45
VI.	LITERATURA CITADA.....	47

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Requerimientos nutritivos para el cultivo de maíz híbrido de alta producción. ....	7
<b>Cuadro 2.</b> Diseño experimental.....	22
<b>Cuadro 3.</b> Tratamientos aplicados .....	23
<b>Cuadro 4.</b> ANOVA Cuadrados medios para cada variable evaluada en el cultivo de Maíz forrajero bajo fertilización biológica, y su nivel de significancia.....	31
Continuación) <b>Cuadro 4.</b> ANOVA Cuadrados medios para cada variable evaluada en el cultivo de Maíz forrajero bajo fertilización biológica, y su nivel de significancia.....	32
<b>Cuadro 5.</b> Prueba de medias DMS ( $P \leq 0.05$ ) de las variables fenológicas que resultaron significativas en el ANOVA, y los rendimientos de maíz forrajero bajo tratamientos biológicos.....	33
<b>Cuadro 6.</b> Análisis inicial de suelo antes de la aplicación de tratamientos biológicos en el cultivo de maíz forrajero.....	37
<b>Cuadro 7.</b> Análisis final de suelo rizosférico después de la aplicación de tratamientos biológicos en el cultivo de maíz forrajero.....	39
(Continuación) <b>Cuadro 7.</b> Análisis final de suelo rizosférico después de la aplicación de tratamientos biológicos en el cultivo de maíz forrajero.....	40
<b>Cuadro 8.</b> Tratamientos con porcentaje de identidad y su relativo más cercano.....	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Gel de agarosa con las muestras amplificadas.....	41
--	----

## RESUMEN

En México el maíz es un cultivo de suma importancia alimentaria y socioeconómica, según el atlas agroalimentario en la última década México produjo en promedio 13,937 millones de toneladas anuales de maíz forrajero, siendo Durango en la región Noreste el segundo lugar en volumen de toneladas producidas con 1,942,154 ton., para 2019 (SIAP, 2020). La producción de maíz forrajero en la Comarca Lagunera en los últimos años ha aumentado de manera intensiva, por lo que el suelo no tiene tiempo de recuperarse. El cultivo de maíz ocupa el segundo lugar en importancia de cultivos, por lo que es necesario buscar opciones que puedan ayudar a mejorar la productividad del suelo sin que el rendimiento se vea afectado. El uso de fertilizantes biológicos que permitan mejorar la producción de grano de maíz es una de las opciones más factibles (De la cruz *et al.*, 2018). Por lo que el uso de RPCV (rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal) se percibe como una de las herramientas más importantes para una agricultura sostenible, así como para la recuperación de ecosistemas degradados. En el presente estudio se determinó el efecto de diferentes tratamientos con RPCV sobre el rendimiento y las propiedades químicas del suelo rizosférico en cultivo de maíz. Se evaluaron 12 tratamientos en un diseño experimental de bloques al azar. El análisis de varianza y comparación de medias se efectuó haciendo uso del procedimiento GLM del Software Statistical Analysis System (SAS, 2010). Los tratamientos con bacterias se aplicaron en las semillas en concentración  $1 \times 10^9$ . Los tratamientos que se evaluaron fueron los siguientes: T1=*Azospirillum brasilense*, T2=*Bacillus subtilis*, T3=*Bacillus atrophaeus*, T4=*Bacillus velezensis*, T5=*Bacillus sp.*, T6= Producto comercial Micorroot, T7= Blanco, T8=*Azospirillum brasilense* + *Bacillus subtilis*, T9=*Azospirillum brasilense* + *Bacillus atrophaeus*, T10=*Azospirillum brasilense* + *Bacillus velezensis*, T11=*Azospirillum brasilense* + *Bacillus sp.* y T12=*Azospirillum brasilense* + Micorroot. Se midieron distintas variables fenológicas de la planta para evaluar el efecto de los tratamientos. Además de estimar el rendimiento del cultivo y las propiedades químicas de suelo. Se observó que los tratamientos biológicos (T1=

*Azospirillum brasilenses* y T2= *Bacillus subtilis*) mejoraron significativamente el volumen de la raíz (V raíz) y el peso seco de raíz (PS raíz) de plantas de maíz. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas en las estimaciones de rendimiento verde ni seco. Se observaron cambios en las propiedades químicas del suelo rizosférico del cultivo, por lo que se puede considerar su uso como una alternativa de fertilización viable, siempre y cuando se establezca una metodología que se involucre desde la inoculación, establecimiento, proliferación y sobrevivencia de las RPCV.

## SUMMARY

In Mexico, corn is a crop of great food and socioeconomic importance, according to the agri-food atlas, in the last decade Mexico produced an average of 13,937 million tons of feed corn per year, with Durango in the Northeast region being second in volume of tons produced with 1,942,154 tons., for 2019 (SIAP, 2020). Fodder corn production in the Comarca Lagunera in recent years has increased intensively, so the soil does not have time to recover. Maize is the second most important crop, so it is necessary to look for options that can help improve soil productivity without affecting yield. The use of biological fertilizers that allow improving the production of corn grain is one of the most feasible options (De la Cruz et al., 2018). Therefore, the use of RPCV (plant growth promoting rhizobacteria) is perceived as one of the most important tools for sustainable agriculture, as well as for the recovery of degraded ecosystems. In the present study, the effect of different treatments with RPCV on the yield and chemical properties of rhizospheric soil in maize cultivation was determined. 12 treatments were evaluated in a randomized block experimental design. The analysis of variance and comparison of means was carried out using the GLM procedure of the Software Statistical Analysis System (SAS, 2010). The treatments with bacteria were applied to the seeds in concentration  $[1 \times 10^9]$ . The treatments that were evaluated were the following: T1=*Azospirillum brasilense*, T2=*Bacillus subtilis*, T3=*Bacillus atrophaeus*, T4=*Bacillus velezensis*, T5=*Bacillus sp.*, T6=Microroot commercial product, T7=White, T8=*Azospirillum brasilense* + *Bacillus subtilis*, T9=*Azospirillum brasilense* + *Bacillus atrophaeus*, T10=*Azospirillum brasilense* + *Bacillus velezensis*, T11=*Azospirillum brasilense* + *Bacillus sp.* and T12=*Azospirillum brasilense* + Microroot. Different phenological variables of the plant were measured to evaluate the effect of the treatments. In addition to estimating crop yield and soil chemical properties. It was observed that the biological treatments (T1= *Azospirillum brasilense* and T2= *Bacillus subtilis*)

significantly improved root volume (V root) and root dry weight (root PS) of maize plants. However, there were no statistically significant differences in the estimates of green or dry yield. Changes in the chemical properties of the rhizospheric soil of the crop were observed, so its use can be considered as a viable fertilization alternative, as long as a methodology is established that is involved from the inoculation, establishment, proliferation and survival of the RPCV.

## I. INTRODUCCIÓN

En México el maíz es un cultivo de suma importancia alimentaria y socioeconómica, según el atlas agroalimentario en la última década México produjo en promedio 13,937 millones de toneladas anuales de maíz forrajero, siendo Durango en la región Noreste el segundo lugar en volumen de toneladas producidas con 1,942,154 ton., para 2019 (SIAP, 2020). A pesar de su importancia socio-cultural a escala nacional, el proceso de producción fundamentado en los principios de la agricultura convencional, atraviesa desde hace algunas décadas una difícil situación, debido fundamentalmente al incremento del costo de los insumos, principalmente el de los fertilizantes químicos, los cuales representan un alto porcentaje de los costos totales de producción (Carcaño-Montiel *et al.*, 2006). La producción de maíz forrajero en la Comarca Lagunera en los últimos años ha aumentado de manera intensiva, por lo que el suelo no tiene tiempo de recuperarse. Ocupa el segundo lugar en importancia de cultivos, por lo que es necesario buscar opciones que puedan ayudar a mejorar la productividad del suelo sin que el rendimiento se vea afectado. El uso de fertilizantes biológicos que permitan mejorar la producción de grano de maíz es una de las opciones más factibles (Carvajal-Muñoz y Mera-Benavides, 2010; Chesti *et al.*, 2013).

La biofertilización constituye un componente tecnológico importante que coadyuva a que la producción agrícola sea más sostenible, promueve la sanidad

y la nutrición de los cultivos y reduce el uso de fertilizantes químicos (Ferrera y Alarcón, 2008; Olalde y Serratos, 2008; Holguín *et al.*, 2003). Además de mejorar las condiciones edáficas, evitando la degradación y contaminación del suelo.

El suelo es considerado un espacio heterogéneo definido por sus propiedades físicas, químicas y biológicas. El microbiota del suelo está conformado principalmente por bacterias y hongos, misma que juega un papel sumamente importante en la fertilidad (Adeboye *et al.*, 2006). La densidad y diversidad de microorganismos son susceptibles a variar dependiendo de la especie vegetal, edad y estado nutricional de la planta, de las características físico químicas del suelo, de su manejo y de las condiciones ambientales. Además, muchas de las relaciones que establecen los microorganismos del suelo pudieran beneficiar a la planta cuando ocurren en la zona próxima a sus raíces (rizósfera) que se caracteriza por poseer una gran cantidad de compuestos que son exudados por la planta. La presencia de microorganismos benéficos alrededor de la raíz establece y acelera procesos bioquímicos que influyen sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, lo que está asociado con un incremento de elementos químicos disponibles y la producción de sustancias de crecimiento o de control de patógenos. Sin embargo, debido al mal uso de fertilizantes y plaguicidas, la diversidad de microorganismos benéficos en el suelo, ha disminuido considerablemente en los últimos años. Por lo que el uso de RPCV (rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal) se percibe como una de las herramientas más importantes para la consecución de una agricultura sostenible,

así como para la recuperación de ecosistemas degradados. Las rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas conocidas por sus siglas RPCV son un grupo de diferentes géneros de bacterias que pueden incrementar el crecimiento y la productividad vegetal (Peña y Reyes, 2007).

### **1.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de diferentes tratamientos con RPCV sobre el rendimiento y las propiedades químicas del suelo rizosférico en cultivo de maíz forrajero.

### **1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Evaluar las propiedades químicas del suelo rizosférico tratado con RPCV.

Detectar molecularmente en el sistema radicular del cultivo de maíz la presencia de las diferentes RPCV inoculadas.

### **1.3. HIPÓTESIS NULA**

No existirá diferencia entre los tratamientos con RPCV, en el rendimiento y las propiedades químicas del suelo rizosférico.

### **1.4. HIPÓTESIS ALTERNA**

Al menos uno de los tratamientos con RPCV mostrará diferencia sobre el rendimiento y las propiedades químicas del suelo rizosférico.

## **II. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. Importancia nutricional y económica.**

El maíz es uno de los cultivos más importantes en el mundo desde el punto de vista de la alimentación humana y animal, ocupa el tercer lugar entre los cereales cultivados; su contenido de proteína es de 10-12%, del cual solo el 50% es metabolizable, debido a los altos contenidos de aminoácidos, que reduce la calidad de la proteína; 70% son carbohidratos, de 2-4% aceites, y 2% fibra. Además, el maíz fortalece la producción animal, al utilizarse como base para elaborar concentrados, o la planta para forraje o ensilaje (MAGFOR, 2008).

En términos económicos, según datos oficiales del SIAP, el precio medio de una tonelada de maíz para forraje en 2021 fue de 708.71 pesos. De esta manera, la producción nacional en ese año arrojó una cifra de 12,225,326.84 pesos anuales. Para el estado de Durango el precio promedio por tonelada de maíz para forraje fue de 649.68 pesos y la producción total arrojó 1,854,335.12 pesos. En lo respecta al producto, este cultivo incluye toda la planta, aprovechándose el tallo, las hojas y demás partes del vegetal, aunque con los granos en estado pastoso, es el más adecuado para usar como forraje, ya que contiene más materia seca y elementos digestibles que cualquier otro cultivo (SIAP, 2021).

### **2.2. Condiciones climatológicas óptimas para el cultivo**

Con respecto al clima, el maíz se desarrolla mejor en regiones con temperaturas entre 25 y 30 °C. Dependiendo de la variedad y del clima, el maíz

requiere de 500 a 800 mm de agua. Los períodos críticos de humedad son la germinación, las primeras tres semanas de desarrollo y dos semanas antes y después de la floración que corresponden a la formación de espiga y mazorca y llenado de grano (Jurado Guerra *et al.*, 2014).

Requiere mucha incidencia de luz solar y en climas húmedos su rendimiento es más bajo. Para que se produzca la germinación en la semilla la temperatura debe estar entre los 15 a 20°C. El maíz llega a soportar temperaturas mínimas de hasta 8°C y a después de los 30°C pueden aparecer problemas graves debido a mala absorción de nutrientes minerales y agua. Para la fructificación se requieren temperaturas de 20 a 32°C (INIFAP 2014).

### **2.3. Riego subsuperficial (RGS) con cintilla**

El aprovechamiento del agua en La Comarca Lagunera es considerado deficiente debido, a la falta de conocimiento por parte de los agricultores a las nuevas tecnologías de riego, ya que no dimensionan la problemática que representa la escasez de agua en esta región, lo que hace que no tengan interés por el ahorro y uso eficiente del agua (Fortis *et al.*, 2002).

El sistema de riego por goteo subsuperficial (RGS) se proyecta como una solución a este problema. El RGS consiste en una serie de tuberías, principales y secundarias, que conduce el agua desde la fuente de abastecimiento hasta el lugar del cultivo. La conducción del agua a la planta se realiza mediante mangueras colocadas en hileras, a una profundidad promedio de 20 a 40 cm (Charles *et al.*, 1999). El agua llega a las raíces en forma subsuperficial, de

manera que se evitan las pérdidas directas por la evaporación de la superficie del suelo. Cuando los emisores se colocan en forma subsuperficial, la evapotranspiración es menor de 81 mm (Delphine *et al.*, 2005).

#### 2.4. Requerimientos del cultivo

El maíz es una planta con capacidad de crecimiento rápido y alta producción que requiere cantidades considerables de nutrientes.

Esta gramínea requiere para su desarrollo cantidades importantes de nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), azufre (S) y en menor cantidad otros conocidos como elementos menores o micronutrientes.

En la tabla 1 se presentan las necesidades de algunos elementos nutritivos para el maíz híbrido de alta producción según Deras Flores en su guía técnica “El cultivo de maíz” (Deras Flores, 2015).

**Cuadro 1.** Requerimientos nutritivos para el cultivo de maíz híbrido de alta producción.

Elemento	Kg/ha	Elemento	Kg/ha
Nitrógeno	187	Cobre	0.1
Fósforo	38	Zinc	0.3
Potasio	192	Boro	0.2
Calcio	38	Hierro	1.9
Magnesio	44	Manganeso	0.3
Azufre	22	Molibdeno	0.01

## **2.5. Fertilización del maíz**

El maíz es muy exigente en elementos nutritivos, comparado con otros cultivos, por lo que en un plan de fertilización se debe tomar en cuenta los resultados del análisis químico del suelo y su recomendación, esto le garantiza suplir de los elementos nutritivos necesarios a la planta y evitar gastos innecesarios. Según Deras Flores en su guía técnica “El cultivo de maíz”, el método de aplicación del fertilizante más recomendable es por postura e incorporado (Deras Flores, 2015), Si la aplicación de fertilizantes se realiza de manera tradicional, es decir siguiendo una dosis de fertilización base, se recomienda utilizar 180 kg de nitrógeno + 90 kg de fósforo (180-90-00). Se sugiere aplicar la mitad del nitrógeno (90 kg) y todo el fósforo (90 kg) en presembrado o bien al momento de la siembra; el resto del nitrógeno deberá aplicarse en el primer riego de auxilio (Jurado Guerra *et al.*, 2014).

## **2.6. Requerimientos edáficos del cultivo de maíz forrajero**

### **2.6.1. Subsoleo**

El subsuelo se recomienda en suelos compactados principalmente por el paso de maquinaria. Esta práctica tiene como función romper la capa endurecida del suelo para permitir la aireación del suelo, la infiltración y retención de humedad y el desarrollo de raíces (INIFAP, 2014).

### **2.6.2. Barbecho**

El barbecho se recomienda para incorporar los residuos de cosecha del cultivo anterior y disminuir plagas en desarrollo exponiéndolas a la intemperie. Generalmente se realiza con arados de reja o de discos. Se debe barbechar el terreno y, además, efectuar uno o dos pasos de rastra, de acuerdo a la condición del terreno (INIFAP, 2014).

### **2.6.3. Rastreo**

El rastreo tiene como finalidad despedazar los terrones de tierra que se generaron al realizar la labor del barbecho y permite una cama de siembra adecuada para la germinación de la semilla y establecimiento de la plántula (INIFAP, 2014).

## **2.7. El suelo**

El sistema suelo, está constituido por tres fases; sólida, líquida y gaseosa, la fase sólida es dominante y consiste en partículas de diferentes tamaños rodeadas por agua y gases, cuyas cantidades y composición fluctúan en el espacio y en el tiempo. En términos de peso, los componentes del sistema suelo están divididos de la siguiente forma: materia inorgánica (45%), agua (20-30%), aire (20-30%) y materia orgánica (5%). Hay un intercambio continuo de moléculas y iones entre estas fases, mediados por procesos físicos, químicos y biológicos (Moreno Caselles *et al.*, Porta Casanellas *et al.*, 2003).

De acuerdo con el INEGI (2007), en México existen 26 de los 32 grupos de suelo reconocidos por el Sistema Internacional Base Referencial Mundial del Recurso Suelo (IUSS, 2007). Dominan los Leptosoles (28.3% del territorio), Regosoles (13.7%), Phaeozems (11.7%), Calcisoles (10.4%), Luvisoles (9%) y Vertisoles (8.6%) que, en conjunto, ocupan 81.7% de la superficie nacional.

La alteración de las condiciones del suelo por el manejo puede afectar la producción de los cultivos debido a que influye en la distribución de la materia orgánica y dinámica de nutrientes; como así también sobre la agregación y porosidad del suelo (Ferrerías *et al.*, 2007).

### **2.7.1. Calidad del suelo**

La calidad del suelo se puede definir brevemente como la "adecuación para un uso". Esto significa que la calidad de un suelo dependerá no solamente de su naturaleza dinámica sino además del uso y manejo que se le dé (Larson y Pierce, 1994; Doran y Safley, 1997)

La calidad del suelo ha declinado por el proceso de agriculturización creciente, en muchas situaciones desmedido, sumado al manejo inadecuado de las tierras, lo que ha conducido al deterioro de la estructura del suelo y a la consecuente reducción en el nivel de materia orgánica, con una marcada disminución de la fertilidad química y física del suelo. La alteración de las condiciones del suelo por las prácticas de manejo puede afectar la producción de los cultivos, por un lado, a través de su influencia en la distribución de la materia

orgánica, actividad microbiana y dinámica de nutrientes; y, por otro lado, modificando propiedades físicas del suelo como agregación y porosidad (Martens y Frankenberger, 1992; Salinas *et al.*, 1997; Díaz *et al.*, 2002; citados por Ferreras *et al.*, 2007).

## **2.8. Degradación química del suelo**

La disminución de la fertilidad del suelo, entendida como el decremento neto de nutrimentos y materia orgánica disponibles en el suelo, se debe a un balance negativo entre las entradas de nutrimentos y materia orgánica (vía la fertilización, conservación de los residuos de las cosechas y los depósitos de sedimentos fértiles) y las salidas (representadas por los productos de las cosechas, las quemadas o la lixiviación), todo ello con importantes repercusiones en la productividad del suelo. La disminución de la fertilidad es el tipo de degradación química más importante en el país. La salinización y alcalinización, por su parte, están representadas por un incremento en el contenido de sales en el suelo superficial que provoca, entre otras cosas, la disminución del rendimiento de los cultivos. La salinización o alcalinización se presenta principalmente en las regiones áridas, en las cuencas cerradas y en las zonas costeras que tienen suelos naturalmente salinos (SEMARNAT y CP, 2003).

## **2.9. La rizósfera**

La rizósfera es la región de suelo que está inmediatamente cerca de la superficie de la raíz (Kennedy, 1999). Generalmente los microorganismos utilizados como biofertilizantes se establecen en la rizósfera. Hay diferentes tipos

de sustancias que se difunden desde las raíces y que estimulan la actividad microbiana, como los carbohidratos (azúcares y oligosacáridos), ácidos orgánicos, vitaminas, nucleótidos, flavonoides, enzimas, hormonas y compuestos volátiles (Prescott, Harley y Klein, 1999). En la rizósfera se llevan a cabo aspectos importantes de la interacción suelo-planta, como la toma de nutrientes, la colonización de las raíces por los microorganismos y la degradación de la materia orgánica (INIFAP, 2007). Por otra parte, ocurren diversas interacciones como, la competencia, el mutualismo, depredación y parasitismo (Barea y Azcón-Aguilar, 1982). Y dependiendo del tipo de relación que se establezca los microorganismos pueden ser benéficos o nocivos. El efecto de la rizósfera es mayor para las bacterias seguidas de los hongos e incluso mayor para algunos grupos funcionales de bacterias (por ejemplo, amonificantes, desnitrificantes). En el caso de los microorganismos benéficos la relación es mutualista y se le conoce como simbiosis (INIFAP, 2007).

La rizósfera se extiende desde la superficie de la raíz hasta 2 mm. donde ya el efecto es mínimo y está comprendida por tres zonas. La Ectorizósfera que es la rizosfera externa o suelo rizosférico, es decir la zona que rodea el sistema radicular en íntimo contacto con ella y los microorganismos que ahí crecen. La otra zona es el rizoplano que es la zona compuesta por la superficie de la raíz y los microorganismos y por último la zona de la endorizósfera, formada por el tejido cortical de la raíz invadido y colonizado por los microorganismos (INIFAP, 2007).

## **2.10. Biofertilizante**

La biofertilización es la inoculación de microorganismos promotores del crecimiento vegetal los cuales principalmente son bacterias promotoras del crecimiento vegetal y hongos micorrícicos (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 2000).

Para el caso de los microorganismos promotores del crecimiento vegetal, cuando un inóculo se aplica en partes específicas de la planta como en la semilla, la raíz, el tallo o las hojas, se le puede llamar bioinoculante, es decir, un producto biológico hecho a base de microorganismos que ayudaran a promover el crecimiento vegetal de la planta y de esta manera reducir el uso de agroquímicos y las consecuencias que traen estos consigo. Cuando se utilizan RPCV (rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal) el inóculo proviene de un cultivo puro de una cepa de interés previamente aislada. Posteriormente la bacteria es multiplicada en un medio específico y de ahí transferido a un sustrato acarreador a través de diluciones que permitan cumplir con la concentración requerida (INIFAP, 2007).

## **2.11. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV)**

En respuesta a la necesidad de generar cultivos limpios, con trazas mínimas o nulas de agroquímicos que afectan la salud humana a largo plazo, se ha venido implementado el uso de los microorganismos benéficos del suelo, que pueden promover el crecimiento de las plantas y también evitar la infección del tejido vegetal por patógenos, estos son denominados RPCV (rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal). Estos microorganismos pueden encontrarse

en asociaciones simbióticas o de vida libre. Estos últimos están asociados a las partículas del suelo generando interacciones con las raíces de las plantas, en la zona de la rizósfera (Peña y Reyes, 2007). A finales de la década de los 70, Kloepper *et al.* (1989) fueron los pioneros en introducir el término RPCV para referirse a las rizobacterias capaces de provocar un efecto benéfico en las plantas. Recientemente, la denominación se ha extendido a microorganismos PCV para incluir hongos y cualquier organismo afín (Vessey, 2003). Inoculaciones de RPCV en cultivos de interés agronómico han demostrado el aumento del nitrógeno, fósforo y los niveles de algunos minerales menores que se hacen disponibles para la planta (Bashan y Holguín, 1997; Egamberdieva *et al.*, 2004). Una amplia variedad se ha encontrado que estimula mediante diversos mecanismos el desarrollo de numerosas gramíneas

#### **2.11.1. Género *Azospirillum brasilense***

El género *Azospirillum* fue descubierto en el año de 1925 en suelo holandés, inicialmente fue nombrado *Azotobacter spirillum*, posteriormente se le denominó *Spirillum lipoferum* hasta que en 1978 después de varios aislamientos se tomó la decisión de agrupar dichos organismos en un nuevo género denominado *Azospirillum* en el que inicialmente lo conformaron dos especies, *Azospirillum lipoferum* y *Azospirillum brasilense* (Cuevas, 2002).

El nombre *Azospirillum* proviene del francés *Azote*, que significa nitrógeno y del grupo *Spirillum*, pequeña espiral. Las bacterias pertenecientes a este género son organismos fijadores de nitrógeno, se describen como gram

negativas (Pazos, M. 2000) La morfología de las células depende de la nutrición y edad de la planta. Contienen gránulos de poli-βhidroxibutirato (PHB) como material de reserva y un sistema muy eficiente de adquisición de hierro a través de sideróforos, que le permite secuestrarlo en la rizosfera, haciéndolo no utilizable por otros microorganismos (Steenhoudt y Vanderleyden, 2002).

*Azospirillum* es uno de los géneros de bacterias PCV más estudiados a nivel mundial (Bashan *et al.*, 2004). Este género posee características que le permiten competir en la rizosfera de varias especies de plantas entre ellas el maíz, a pesar de la presencia de la población de bacterias nativas. La inoculación de esta bacteria en las plantas puede llegar a provocar cambios en varios parámetros de su crecimiento, tales como peso seco total, altura de la planta, peso, tamaño del grano, volumen del sistema radical, entre otros, los cuales pueden beneficiar el rendimiento del cultivo. Su mecanismo de acción es la fijación de nitrógeno. El efecto de la inoculación de *Azospirillum* sobre el rendimiento del cultivo en experimentos de campo generalmente está entre 10-30% (Cuevas, 2002).

### **2.11.2. Género *Bacillus***

El género *Bacillus* está formado por un grupo de especies filogenética y fenotípicamente heterogéneas e incluye un total de más de 100 especies. Este género se ha subdividido en cuatro grupos. El primero, *Bacillus sensu stricto* (*B. subtilis* y otras 27 especies más), el segundo *sensu lato* incluye bacilos formadores de esporas redondeadas (*B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. anthracis*),

el tercero está formado por 10 especies dentro de los cuales está, *B. polymyxa* y *B. macerans*, en el cuarto grupo se han reclasificado en dos nuevos géneros (*Aneuribacillus* y *Brevibacillus*) (Tejera-Hernández *et al.*, 2011).

Este género comprende una amplia variedad de tipos fisiológicos, en los cuales se presentan características como la degradación de sustratos derivados de plantas y animales, la producción de antibióticos, la nitrificación y desnitrificación, la fijación de nitrógeno, el parasitismo, entre otras (Tejera-Hernández *et al.*, 2011).

#### **2.11.2.1. Principales especies presentes en el suelo**

Los géneros más comunes encontrados en ecosistemas terrestres son *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum* y *Bacillus*, entre otros. Podemos encontrar una gran diversidad de especies que se asocian a las plantas ejerciendo un efecto positivo para las mismas sobre el crecimiento a través de sus mecanismos de acción que promueven el crecimiento vegetal y el control biológico de patógenos. Se han aislado de cultivos de interés tales como, el algodón, el trigo, el maíz, la papa y el arroz (Hernández *et al.*, 2003).

#### **2.11.2.2. Mecanismos de acción del género *Bacillus***

La promoción del crecimiento por parte de este género puede suceder de forma directa e indirecta. Una forma directa es la capacidad que tienen de llevar a cabo la fijación del nitrógeno, la solubilización de minerales como el fósforo y producción de hormonas reguladoras del crecimiento vegetal. De forma indirecta

se habla de la promoción del crecimiento con la producción de sustancias que actúan como antagonistas de patógenos o proporcionando resistencia en las plantas (Muleta *et al.*, 2007). Existen distintos tipos de mecanismos tales como;

#### **2.11.2.2.1. Reguladores del crecimiento vegetal**

Dentro de estos se encuentran las fitohormonas, formadas por un grupo de sustancias con actividad biológica que actúan sobre una parte de la planta, causando un efecto de crecimiento específico, entre ellas se encuentran las auxinas, giberelinas y citoquininas.

#### **2.11.2.2.2. Solubilización de fosfatos**

El fósforo es uno de los nutrientes limitantes del crecimiento de las plantas. Dentro de las funciones que se le han atribuido, se encuentran la captación, almacenamiento y transferencia de energía, entre otros. La mayor cantidad de los fosfatos inorgánicos aplicados al suelo son inmovilizados, por lo que los microorganismos que colonicen el sistema radicular y tengan la capacidad de solubilizar el fósforo y hacerlo disponible para la planta son considerados promotores del crecimiento vegetal y entre estos principalmente se encuentran los del género *Bacillus* y dentro de él se destacan las especies *B. megaterium* y *B. Subtilis* (Tejera-Hernández *et al.*, 2011).

#### **2.11.2.2.3. Fijación de nitrógeno**

La fijación biológica del nitrógeno es un proceso microbiano en el que el nitrógeno atmosférico se reduce a amonio y se incorpora a la biomasa, con lo que pasa a constituir la fuente principal de nitrógeno para las plantas (Marot-Gaudry, 2011). El género *Bacillus* presenta una gran versatilidad metabólica y se

ha demostrado su capacidad de llevar a cabo el proceso de fijación biológica de nitrógeno. Múltiples especies de *Bacillus* se han detectado en el estudio respecto a la fijación biológica del nitrógeno por miembros de este género, los cuales desempeñan un papel importante desde el punto de vista ecológico (Tejera-Hernández *et al.*, 2011).

### **2.12. Colonización de la raíz y distribución de las BPCV en la rizósfera.**

Además de las características del cultivo, la disponibilidad de nutrientes en la rizosfera está controlada por los efectos que ejercen las propiedades del suelo sobre las interacciones de las raíces con los microorganismos (Loredo-Osti *et al.*, 2004).

La colonización de la raíz es el proceso por el cual las bacterias que sobreviven a la inoculación en las semillas se multiplican en la espermósfera en respuesta a los exudados de la semilla, se transfieren al sistema radical en vías de desarrollo y logran multiplicarse en las raíces (Loredo-Osti *et al.*, 2004).

### **2.13. Competencia de bacterias inoculadas con nativas del suelo**

Cuando las bacterias se inoculan en condiciones asépticas, no tienen competencia, por lo cual la densidad de su población en la rizosfera probablemente está determinada sólo por la disponibilidad de carbono de los exudados. Sin embargo, en condiciones naturales, la competencia por los exudados entre los microorganismos es intensa. Si una determinada población bacteriana es alta, las bacterias estarán presentes en un mayor número de raíces

vecinas y tendrán mayor disponibilidad de exudados que aquéllas con baja densidad (Hatzinger y Alexander, 1994).

La incapacidad de diversos inoculantes para mejorar el rendimiento de los cultivos, con frecuencia, se atribuye a la ineficiencia de estas bacterias para colonizar consistentemente la rizósfera (Hatzinger y Alexander, 1994).

El éxito en la promoción del crecimiento de las plantas, cuando se introducen bacterias benéficas depende, en gran medida, de un establecimiento oportuno y de su persistencia a lo largo de la estación de crecimiento de la raíz (Schippers *et al.*, 1987).

#### **2.14. Gen 16S**

El ARNr 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 nucleótidos codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S. Esta molécula ha sido reconocida como un poderoso marcador universal debido a que se encuentra en todos los organismos conocidos (Rodicio y Mendoza, 2004).

Está considerado como una herramienta estandarizada para la identificación de diversos organismos, llamado código de barras de ADN. A partir de esto se generó una metodología, que se basa en la amplificación de una región específica del ADN por medio de la reacción en cadena de polimerasa (PCR). y la región propuesta fue un fragmento de 600 pares de bases del ADN mitocondrial, que codifica para la subunidad I del citocromo *c* oxidasa (COI). El uso de la región COI fue excelente herramienta para la clasificación taxonómica

de muchos animales, incluso para distinguir entre especies; sin embargo, su utilidad para estudios taxonómicos y/o filogenéticos en plantas, hongos y microorganismos estuvo limitada (Blaxter 2004, Lebonah *et al.*, 2014) y fue necesario buscar otras secuencias o genes candidatos que pudieran usarse como marcadores. Lo anterior ha permitido que las secuencias del ARNr 16S sean utilizadas como una herramienta importante en la reconstrucción de relaciones filogenéticas.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Localización geográfica**

La Comarca Lagunera se encuentra ubicada en el norte-centro de México y está conformada por los estados de Coahuila y Durango. Se localiza en las coordenadas geográficas 103° 25' 55" longitud oeste del meridiano de Greenwich y 24° 22' 00" de latitud norte, con una altura de 1120 msnm

#### **3.2. Localización del sitio experimental**

El experimento se llevó a cabo en el ciclo de primavera-verano 2020 en el campo experimental de la Universidad Juárez del Estado de Durango; Facultad de Agricultura y Zootecnia ubicada en la localidad de Venecia localizada en el Municipio de Gómez Palacio del Estado de Durango, México. Carretera Gómez Palacio – Tlahualilo, km 35 y se encuentra en las coordenadas GPS: a 25° 46' 56" LN y 103° 21' 02" LO.

La localidad se encuentra a una mediana altura de 1100 metros sobre el nivel del mar. Forma parte de la comarca lagunera, por lo que es una zona caracterizada por la escasez de recursos hídricos y con un clima semidesértico, además de un suelo pobre en materia orgánica y el subsuelo es rico en arcilla o carbonatos, con baja susceptibilidad a la erosión.

#### **3.3. Preparación del terreno**

La preparación del terreno consistió inicialmente en meter subsuelo para romper el suelo a profundidades por debajo de la capa arable, eso con la finalidad de aumentar la infiltración de aire y las raíces, posteriormente se

realizó el barbecho para romper, aflojar y voltear la capa de suelo, enterrar los residuos y maleza para su descomposición y aumentar de esta manera el contenido de materia orgánica del suelo. Se llevó a cabo el rastreo para desmoronar los terrones, dejando el suelo con una textura adecuada para realizar las demás labores.

### 3.4. Diseño experimental

Se realizaron 12 tratamientos en un diseño de bloques al azar con tres repeticiones, se trazaron 36 unidades experimentales las cuales constan de 17.5 m<sup>2</sup>, teniendo una distancia de 0.7 m entre surcos.

**Cuadro 2.** Diseño experimental

	<b>B1</b>	<b>B2</b>	<b>B3</b>
	T7	T12	T1
	T4	T11	T2
	T5	T10	T3
	T3	T7	T4
	T2	T9	T5
	T1	T8	T6
<b>Tratamientos</b>	T6	T1	T7
	T11	T2	T8
	T8	T3	T9
	T12	T4	T10
	T9	T5	T11
	T10	T6	T12

T=Tratamiento B=Bloques

Los tratamientos fueron los siguientes:

### **Cuadro 3.** Tratamientos aplicados

TRATAMIENTO	concentración $1 \times 10^9$
1	<i>Azospirillum brasilense</i>
2	<i>Bacillus subtilis</i>
3	<i>Bacillus atrophaeus</i>
4	<i>Bacillus velezensis</i>
5	<i>Bacillus sp.</i>
6	Producto comercial Micorroot
7	Blanco
8	<i>Azospirillum brasilense</i> + <i>Bacillus subtilis</i>
9	<i>Azospirillum brasilense</i> + <i>Bacillus atrophaeus</i>
10	<i>Azospirillum brasilense</i> + <i>Bacillus velezensis</i>
11	<i>Azospirillum brasilense</i> + <i>Bacillus sp.</i>
12	<i>Azospirillum brasilense</i> + Micorroot

### **3.5. Riego**

El cultivo se regó mediante un sistema de riego por goteo con una lámina de riego de 1.5 l/s.

### **3.6. Siembra de cultivo**

El cultivo de maíz se sembró el 22 de agosto del 2020, por medio de una siembra manual, para un ciclo intermedio.

### **3.7. Material genético**

Fue una variedad de híbrido 4082W de 120 días, desarrollada por casa semillera Pioneer.

### **3.8. Inoculación de las PGPR en las semillas**

Las cepas fueron donadas por la Universidad Autónoma de Coahuila. Las bacterias se multiplicaron masivamente en el laboratorio de biotecnología de la Facultad de Agricultura Y Zootecnia. El crecimiento de los microorganismos en estudio, se realizó en medio de cultivo líquido YPG y se dejó incubar durante 24 h. Se aplicaron las bacterias en concentración  $1 \times 10^9$  en las semillas, se inoculó su tratamiento correspondiente por un tiempo de reposo de 30 min.

### **3.9. Cosecha**

La cosecha se llevó a cabo el 09 de noviembre de 2020 se tomó como indicador que el grano estuviera a 2/3 de la línea de leche, para tomar los datos de las variables a evaluar.

### **3.10. Variables agronómicas a evaluar**

#### **3.10.1. Altura de la planta**

La variable fue medida al momento de cosechar, con el apoyo de una cinta métrica se midieron desde la base de la caña hasta el último entrenudo. Se midieron las plantas contenidas en 2 metros líneas de 2 surcos, por cada unidad experimental. Los resultados fueron expresados en centímetros (cm).

### **3.10.2. Diámetro del tallo**

La variable fue medida al momento de cosechar, con el apoyo de un vernier de la marca Truper se midió el diámetro ecuatorial entre el primer y segundo entrenudo de la caña. Se midieron las plantas contenidas en 2 metros líneas de 2 surcos, por cada unidad experimental. Los resultados fueron expresados en centímetros (cm).

### **3.10.3. Volumen de raíz**

El volumen de cada sistema radicular se estimó mediante el método de desplazamiento de volumen de agua. Consistió en colocar el sistema radicular dentro de un vaso de precipitado con capacidad de 2 litros, posteriormente con la ayuda de una probeta graduada con capacidad de 1 litro se agregó agua al vaso de precipitado con el sistema radicular en su interior, hasta alcanzar la marca de 2 litros. El volumen de agua que sobro en la probeta con capacidad de 1 litro, se midió con otra probeta con capacidad de 100 ml, para calcular la cantidad de centímetros cúbicos de raíz, en función de los centímetros cúbicos de agua restante.

### **3.10.4. Peso fresco y seco de la planta (g)**

Para determinar el peso fresco de la planta se tomaron muestras de distintos surcos durante la madurez fisiológica de la planta, las plantas fueron cortadas a nivel de suelo y se pesaron. Posteriormente las plantas se cortaron

en pedazos y se secaron a 80° en una estufa durante 24 h, retirando las mazorcas y pesando solamente el resto de la planta.

### **3.11. Recolección de suelo rizosférico**

En primer paso se extrajo el sistema radicular de las plantas, con apoyo de una pala de pico. Posteriormente el sistema radicular se golpea suavemente para permitir que el suelo más cercano a las raíces se desprenda, y poder tomar la muestra de suelo rizosférico de aproximadamente 2 kilogramos, en bolsas de plástico estériles. Las muestras de suelo rizosférico se tomaron de cada unidad experimental.

### **3.12. Propiedades químicas del suelo a evaluar**

#### **3.12.1. Materia orgánica**

La determinación de la materia orgánica del suelo, se realizó a partir del suelo más próximo a las raíces de las plantas de maíz. Los análisis se realizaron en el laboratorio de suelo de la Facultad de Agricultura y Zootecnia. Se utilizó el método de Walkley y Black.

#### **3.12.2. Conductividad eléctrica**

La determinación de la conductividad eléctrica, se realizó a partir del suelo más próximo a las raíces de las plantas de maíz. Los análisis se realizaron en el laboratorio de suelo de la Facultad de Agricultura y Zootecnia utilizando el método AS-18 establecido en la NOM-021-SEMARNAT-2000, por medición electrolítica y una celda de conductividad como sensor.

### **3.12.3. pH**

La determinación del pH, se realizó a partir del suelo más próximo a las raíces de las plantas de maíz. Los análisis se realizaron en el laboratorio de suelo de la Facultad de Agricultura y Zootecnia utilizando el método AS-02 establecido en la NOM-021-SEMARNAT-2000.

### **3.12.4. Nitrógeno mineral**

La determinación de Nitrógeno inorgánico, se realizó a partir del suelo más próximo a las raíces de las plantas de maíz. Los análisis se realizaron en el laboratorio de suelo de la Facultad de Agricultura y Zootecnia utilizando el método AS-08 establecido en la NOM-021-SEMARNAT-2000.

### **3.12.5. Fósforo**

La determinación de fósforo aprovechable, se realizó a partir del suelo más próximo a las raíces de las plantas de maíz. Los análisis se realizaron en el laboratorio de suelo de la Facultad de Agricultura y Zootecnia, por el método AS-10 establecido en la NOM-021-SEMARNAT-2000.

### **3.13. Aislamiento y selección de colonias del género *Bacillus* sp.**

Se realizaron cortes transversales de raíz (3 cm de largo) en cada una de las muestras obtenidas de las plantas, se colocaron en tubos de ensaye y se lavaron con agua corriente para eliminar el suelo adherido, posteriormente se llenaron con agua destilada hasta cubrir el total de raíces, después se llevaron a una temperatura de 80°C en placa de calentamiento durante 20 min, con el fin de

separar las bacterias del género *Bacillus*, las que tienen la capacidad de producir esporas en diversas condiciones de estrés (Cortés-Sánchez *et al.*, 2017).

Después se eliminó el agua contenida y se colocaron tres cortes de raíces en agar nutritivo (BD Bioxon), y se incubaron a 37°C durante 48h. Sucediada la incubación se seleccionaron colonias con forma irregular, color crema, apariencia ondulada, además se consideró las características digitiforme, lobulada o aserrada en los bordes y de consistencia cremosa (Calvo y Zúñiga, 2010).

### **3.14. Aislamiento y selección de cepas de *Bacillus* fijadoras de nitrógeno**

La selección de cepas de *Bacillus*, con capacidad de fijar nitrógeno se hizo de las colonias previamente aisladas. Se purificaron utilizando agar nutritivo a 37°C por 48h; posteriormente se pasaron al medio NFb (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 gL<sup>-1</sup>, ácido málico 5 g/L, KOH 4 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05 g/L, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.01 g/L, NaCl 0.02 g/L, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.01 g/L, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.002 g/L, azul de bromotimol al 0.5% -en etanol-, agar bacteriológico 16 g/L), a 33°C (Stanier *et al.*, 1996). Una vez obtenido el crecimiento, se evaluó la morfología colonial en medio de cultivo sólido. Posteriormente se realizó la tinción de Gram (Madigan *et al.*, 2004). Una vez seleccionadas las cepas de *Bacillus*, con capacidad de fijar N<sub>2</sub>, fueron colocadas en glicerol (Jalmek) al 50% a una temperatura de -20°C, para su conservación. Del proceso de aislamiento de colonias, se recuperaron cinco aislados del género *Bacillus*, con capacidad de fijar N<sub>2</sub>.

### **3.15. Extracción de DNA para la identificación de cepas aplicadas**

Se reactivaron las bacterias seleccionadas en medio YPG (extracto de levadura-peptona-glucosa) [extracto de levadura 10 g/L, peptona 10 g/L, glucosa 10 g/L] líquido y se colocaron en un agitador (LUZEREN) a 30°C a 150 rpm por 18h.

La extracción se llevó a cabo de acuerdo al protocolo del método de bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) que fue elaborado por Murray y Thompson en 1980 (Murray y Thompson, 1980) el cual está especialmente indicado para eliminar los polisacáridos y los compuestos polifenólicos. Según Lipp *et al.* (2001) el método es adecuado para extraer y purificar ADN de vegetales y alimentos derivados de vegetales.

### **3.16. Identificación molecular por secuenciación del gen 16S rDNA**

Se realizó PCR en punto final con iniciadores universales para bacterias 16S rRNA. Se realizó una mezcla de amplificación en un volumen final de 25 µl, compuesto por 13.37 µl de agua MQ, 5 µl de buffer PCR (10X), 4 µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0.50 µl de dntp's (10 mM), 0.50 µl de cada iniciador (27F AGAGTTTGATCMTGGCTCAG y 1492R GGTTACCTTGTTACGACTT), 0.13 µl de ADN Taq-polimerasa y 1 µl de ADN muestra. Todos los reactivos pertenecen a un kit de la marca PROMEGA, a excepción de los iniciadores, estos son de marca SIGMA, sintetizados de acuerdo al programa térmico establecido. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador de punto final (marca ThermoFisher Scientific "MiniAmp Plus"), con un programa térmico de 1x

(0:05:00 94°C), 35x (94°C-0:00:30), (55°C- 0:00:30), (72°C-0:01:30) y ciclo 1/1 (72°C-0:05:00). Las bandas amplificadas se observaron en un gel de agarosa al 1.5% y se utilizó el marcador de peso molecular marca PROMEGA (100-1500 pb). Los productos de amplificación fueron analizados en una electroforesis en geles de agarosa al 1.5% teñidos con gel red (2.5 µl gel red/ 3 µl muestra) a 80 V durante 45 min. Las bandas de DNA fueron visualizadas por iluminación UV.

Los productos de amplificación para el gen 16S rDNA fueron enviados a purificar y secuenciar en ambas direcciones (con los partidores 27F y 1492R) se realizaron en la empresa Macrogen en Maryland U.S.A.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias individuales del gen 16S rDNA publicadas en el Genbank con su servidor BLAST del National Centre for Biotechnology information (NCBI).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1. Variables fenológicas

El análisis de ANOVA para las diferentes variables evaluadas muestra que existe diferencia significativa para las variables de diámetro de tallo (Diám), volumen de raíz (V raíz) y peso seco de raíz (PS raíz). Para las demás variables no hubo diferencias significativas.

**Cuadro 4.** ANOVA Cuadrados medios para cada variable evaluada en el cultivo de Maíz forrajero bajo fertilización biológica, y su nivel de significancia.

	<b>FV</b>	<b>Diám</b>	<b>P V</b>	<b>P S</b>
<b>Repetición</b>		0.02 ns	0.02 ns	65.5 ns
<b>Tratamiento</b>		0.01 *	0.28 ns	315.6 ns

Diám= diámetro basal del tallo; PV= peso verde; PS= peso seco; ns=no significativo; \*= significativo al 0.05.

(Continuación) Cuadro 4. ANOVA Cuadrados medios para cada variable evaluada en el cultivo de Maíz forrajero bajo fertilización biológica, y su nivel de significancia.

<b>FV</b>	<b>R V</b>	<b>R S</b>	<b>V raíz</b>	<b>P S raíz</b>
<b>Repetición</b>	5.2 ns	3.0 ns	1972.3 ns	382.8 ns
<b>Tratamiento</b>	51.0 ns	6.4 ns	2381.8 *	160.7 *
<b>Error</b>	76.9 ns	10.2 ns	1055.2 ns	85.0 ns

RV= rendimiento verde; RS= rendimiento seco; V raíz= volumen de raíz; PS raíz=peso seco de raíz; ns=no significativo; \*= significativo al 0.05.

**Cuadro 5.** Prueba de medias DMS ( $P \leq 0.05$ ) de las variables fenológicas que resultaron significativas en el ANOVA, y los rendimientos de maíz forrajero bajo tratamientos biológicos.

Tratamiento	Diám (cm)	RV ton ha <sup>-1</sup>	RS ton ha <sup>-1</sup>	V raíz (cm <sup>3</sup> )	PS raíz (g)
1	1.46 B	75.7 A	16.8 A	213.8 A	42.6 B
2	1.54 A	75.5 A	19.3 A	181.6 A	53.1 A
3	1.57 A	83.8 A	19.2 A	138.8 B	40.8 B
4	1.50 B	76.5 A	20.7 A	142.8 B	42.9 B
5	1,50 B	70.0 A	19.4 A	126.1 C	26.4 C
6	1.49 B	77.0 A	15.8 A	132.7 B	32.3 B
7	1.62 A	82.3 A	16.5 A	127.0 B	44.6 B
8	1.72 A	77.0 A	17.2 A	121.8 C	40.4 B
9	1.46 B	79.3 A	16.9 A	172.6 B	35.6 B
10	1.58 A	72.8 A	17.1 A	166.1 B	36.4 B
11	1.69 A	74.8 A	18.1 A	131.1 B	38.2 B
12	1.60 A	70.9 A	17.5 A	137.2 B	28.7 C

Diam= diámetro; RV= rendimiento verde; RS= rendimiento seco; V raíz= volumen de raíz; PS raíz=peso seco de raíz

#### 4.1.1. Diámetro del tallo

El diámetro del tallo es un parámetro de gran importancia en las plantaciones de maíz, ya que influye sobre el doblamiento de los tallos cuando son afectados por fuertes vientos (Vásquez y Ruiz, 1993). Para la variable diámetro del tallo (Diám), se observa que el T2 (*Bacillus subtilis*), el T3 (*Bacillus atrophaeus*), el T7 (Blanco), el T8 (*Azospirillum brasilense* + *Bacillus subtilis*), el T10 (*Azospirillum brasilense* + *Bacillus velezensis*), el T11 (*Azospirillum brasilense* + *Bacillus sp.*) y el T12 (*Azospirillum brasilense* + Micorroot) fueron

los que presentaron los valores más altos (Cuadro 5). Sin embargo, el T8 demostró el mayor diámetro de tallo (1.72 cm), lo cual indica que el T1 (*Azospirillum brasilense*), el T4 (*Bacillus velezensis*), el T5 (*Bacillus sp.*), el T6 (Producto comercial Micorroot) y el T9 (*Azospirillum brasilense* + *Bacillus atrophaeus*), mostraron valores desfavorables para la planta, debido a la inestabilidad que puede presentar según un estudio hecho por Rodríguez *et al.*, 2016. Por otra parte, las altas densidades de siembra y la competencia por luz con las malezas provocan una elongación de los tallos y plantas más altas, reduciendo el grosor de los tallos. Los tallos delgados es un símbolo de raquitismo por deficiencia nutricional del vegetal (Blessing y Hernández ,2009).

#### **4.1.2. Rendimiento verde**

En el rendimiento verde según el análisis de varianza realizado (Cuadro 4) no existe diferencia significativa. Aun así, el T3 (*Bacillus atrophaeus*) fue el que obtuvo el valor más alto (83.8 ton ha<sup>-1</sup>), como ya se mencionó y se observa en el Cuadro 2 no hubo diferencia significativa entre tratamientos, sin embargo, todos los tratamientos incluido el testigo mostraron valores superiores a la media para el rendimiento verde, SIAP (2020) para la comarca lagunera (41.1 ton ha<sup>-1</sup>). Por lo que la similitud entre los datos obtenidos los podemos atribuir a las propiedades fisicoquímicas del suelo inicial, ya que contaba con valores muy altos de materia orgánica (3.16%) así como de Nitrógeno (216.32 ppm), Fósforo (40.35 ppm) y Potasio (2103.88 ppm) lo que trae como resultado la proliferación

óptima de las BPCV y por consiguiente una mayor promoción del crecimiento tal como lo menciona Aslantas *et al.*, 2007.

#### **4.1.3. Rendimiento Seco**

En el rendimiento seco el T4 (*Bacillus velezensis*) demostró el mayor rendimiento (20.7 ton ha<sup>-1</sup>) y el rendimiento promedio de materia seca obtenido en este experimento osciló entre los 15 y 21 ton ha<sup>-1</sup> lo que coincide con el promedio registrado en la región de Durango, donde la producción de MS promedio de maíz forrajero es de 20 t MS ha<sup>-1</sup>, similar a la que obtuvieron (Núñez *et al.*, 2006). Reis *et al.* (2000) mencionan que la inoculación de BPCV en gramíneas favorece la producción de materia seca en las raíces y parte aérea, lo cual se ve reflejado en un mejor rendimiento. Sin embargo, no existiendo diferencia estadística significativa se obtuvieron diferencias numéricas como en el caso de T4 (*Bacillus velezensis*) que obtuvo el mejor rendimiento, siendo hasta un 20% mayor que el testigo, dato que coincide con lo mencionado por Ayoub *et al.* (2022). Trasladando dichas diferencias numéricas a un panorama real, representan una mejora en el rendimiento de derivados animales, tales como la leche, lo cual está relacionado con el suministro de fibra fermentable, el aporte energético del forraje de maíz para lactación-engorde y otros nutrientes digestibles, que influyen en el consumo de toda la ración e incrementan el rendimiento lechero de los animales (Granzin 2004).

#### **4.1.4. Volumen de raíz y peso seco de raíz**

Las variables de volumen de raíz (V raíz) y peso seco de raíz (PS raíz) mostraron diferencia significativa y los datos medios obtenidos para el peso seco de raíz está dentro de un rango favorable según estudios realizados por De Araujo *et al.*, 2012. En la variable volumen de raíz (V raíz), fue el T1 (*Azospirillum brasilense*) y el T2 (*Bacillus subtilis*) los que mostraron los valores más altos, 213.8 cm<sup>3</sup> y 181.6 cm<sup>3</sup> respectivamente, en la variable peso seco de raíz (PS raíz) fue el T2 (*Bacillus subtilis*) el que presento el mayor valor (53.1 g). Coincidiendo con lo mencionado por Sánchez *et al.*, 2012 en un estudio donde inocularon plantas de tomate con diferentes RPCV, *Bacillus* mostró respuesta positiva en cuanto a la elongación de la raíz y al aumento del peso seco de la planta. La aplicación de biofertilizantes que incluyen *B. subtilis* mejoran el crecimiento de las raíces (Bo *et al.*, 2020; Fangying *et al.*, 2021).

#### **4.2. Análisis inicial de suelo**

En el siguiente cuadro muestra los resultados obtenidos en el análisis del suelo de la muestra inicial. Como se puede observar los valores de MO, N-NO<sup>3</sup> y P se encuentran clasificados en muy alto según la Norma oficial mexicana (NOM-021-SEMARNAT-2000). El nivel de pH es medianamente alcalino en un rango de 8.37, siendo este un valor relativamente dentro de los estándares para cultivar maíz forrajero (5-8), siendo entre 5.5-7.5 sus valores óptimos (Ruiz *et al.*, 2013) y en la conductividad eléctrica (CE) está clasificada como suelo Salino con un valor de 6.17, siendo este un valor critico que disminuye hasta en un 50% el

rendimiento del cultivo (Doorenbos y Kassam, 1979, Ayers y Westcot 1985; citados por Ruiz *et al.*, 2013).

**Cuadro 6.** Análisis inicial de suelo antes de la aplicación de tratamientos biológicos en el cultivo de maíz forrajero.

Parámetros	Unidades	Resultado	Clasificación	Rango
Materia Orgánica (MO)	%	3.16	Muy alto	0.50-2.00
Nitrógeno (N-NO <sub>3</sub> )	ppm	216.32	Muy alto	6.7-66.8
Fósforo disponible (P)	ppm	40.35	Muy alto	4.00-36.00
pH		8.37	Medianamente alcalino	
CE	dS/m	6.17	Suelo salino	

#### 4.3. Análisis Final de suelo

En cuadro 7 muestra los valores obtenidos en los diferentes análisis practicados al suelo para cada una de las muestras de suelo final por tratamiento.

Como se puede observar en el cuadro 6 el suelo inicial contaba con altos niveles de MO, NO<sub>3</sub> y P y de acuerdo con Chotte *et al.*, 2002 las reservas de N están constituidas por la materia orgánica (MO) de descomposición rápida en medios biológicamente activos, quedando disponible para las plantas a través del proceso de mineralización (conversión de N orgánico a inorgánico), en el cual participan activamente los microorganismos como las RPCV.

En el presente trabajo no se utilizó ningún otro tipo de fertilización por lo cual, la disminución de MO, N y P, que se observa numéricamente en el Cuadro 7, la podemos atribuir a la estimulación bacteria-planta para ser más eficiente y promover la recuperación de nutrientes del suelo (Pii *et al.*, 2015). Además de corroborar el trabajo de las RPCV en el suelo, las cuales incrementan la disponibilidad de los nutrientes en la rizósfera, influyendo en el metabolismo de la planta, mejorando su nutrición con los distintos mecanismos de acción de las RPCV (Glick 1995; Dobbelaere *et al.*, 2003).

Los valores de pH se mantuvieron estables rondando entre (8.0-8.4) coincidiendo con los valores correspondientes a suelos de La Comarca Lagunera aledaños a el sitio experimental, los cuales de igual manera rondan entre 8.0-8.5 según un estudio acerca de la relación de díeldrin y propiedades del suelo en la Comarca Lagunera, México., hecho por García *et al.*, 2017.

Para la conductividad eléctrica (CE) existió un descenso, lo cual implica una disminución de las sales solubles en el suelo, y por lo tanto una alternativa viable para la adecuación del suelo (Bohn, Hinrich y otros, 1985). Por lo que el aumento del microbiota se ve representado en una reducción de la cantidad de sales disueltas en el suelo (Martínez Reyes *et al.*, 2018).

#### **4.4. Amplificación de las muestras**

En la Figura 1 se puede observar el gel de agarosa donde se visualizó la amplificación del ADN. Carril 9 marcador de peso molecular, carril 2 y 6 vacíos,

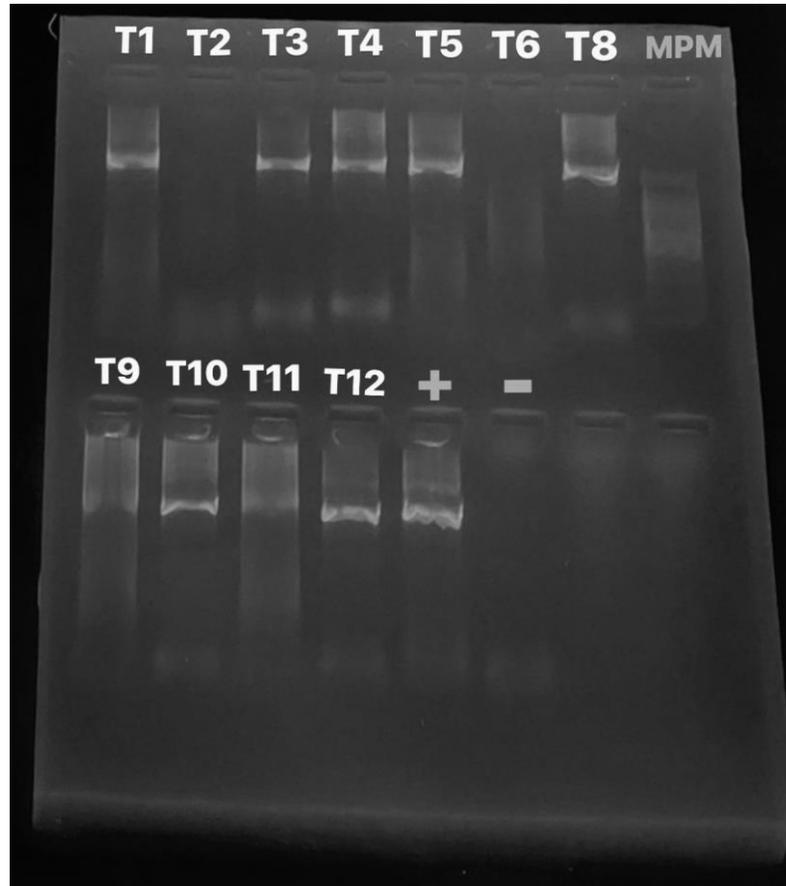
carril 1, 3, 4, 5, 8, 10, 11,12 y 13 muestras amplificadas correctamente, carril 14 y 15 controles positivo (+) y negativo (-).

**Cuadro 7.** Análisis final de suelo rizosférico después de la aplicación de tratamientos biológicos en el cultivo de maíz forrajero.

Tratamiento	pH	Clase	N ppm	Clase	M.O %	Clase
1	8.41	Moderadamente alcalino	4.52	Muy bajo	0.71	Pobre
2	8.3	-----	2.11	----	0.24	Extremadamente pobre
3	8.3	-----	1.66	----	2.02	Mediana
4	8.32	-----	2.11	----	2.74	Medianamente rico
5	8.26	-----	2.56	-----	3.81	Rico
6	8.2	-----	3.47	-----	1.67	Medianamente pobre
7	8.12	-----	2.56	-----	1.19	Pobre
8	8.26	-----	2.71	-----	1.90	Mediana
9	8.23	-----	2.26	-----	3.33	Rico
10	8.05	-----	4.98	-----	1.67	Medianamente pobre
11	8.14	-----	3.32	-----	1.90	Mediana
12	8.18	-----	2.86	-----	2.14	Mediana

(continuación) **Cuadro 7.** Análisis final de suelo rizosférico después de la aplicación de tratamientos biológicos en el cultivo de maíz forrajero.

<b>Tratamiento</b>	<b>P ppm</b>	<b>Clase</b>	<b>CE mS/cm</b>	<b>Clase</b>
1	0.05	Bajo	0.73	Suelo no salino
2	0.19	Muy Alto	1.23	----
3	0.07	Bajo	0.57	----
4	0.02	Muy Bajo	0.87	----
5	0.12	Alto	1.75	----
6	0.14	Muy Alto	1.96	----
7	0.17	Muy Alto	2.1	Ligeramente Salino
8	0.16	Muy Alto	0.68	----
9	0.10	Alto	0.81	----
10	0.19	Muy Alto	1.88	----
11	0.10	Alto	1.23	----
12	0.10	Medio	0.96	----



**Figura 1** Gel de agarosa con las muestras amplificadas

La electroforesis en gel de agarosa permite observar y valorar la integridad de la muestra de ADN. Por lo que según el CIT (Carte d'Identité de Tumeurs) y JGI (Joint Genome Institute) se considera que una muestra de ADN es íntegra cuando su perfil en una electroforesis en gel de agarosa corresponde a una banda discreta. El nivel de degradación de una muestra está determinado por la pérdida de definición de la banda predominante y el acompañamiento de una estela o smear a lo largo del gel. Tal como el caso de la muestra 2 y 6, asumiendo así que dichas muestras se encontraban degradadas, esto pudo haberse dado debido a

diversas situaciones, tales como los ciclos de descongelamiento por bajas de energía o tiempo de almacenamiento.

#### 4.5. Secuenciación del gen 16S rDNA

**Cuadro 8.** Tratamientos con porcentaje de identidad y su relativo más cercano.

<b>Tratamiento</b>	<b>Origen</b>	<b>Relativo más cercano</b>	<b>% de ident.</b>
1 <i>Azospirillum brasilense</i>	Raíz	<i>Pseudomonas sp.</i>	98%
3 <i>Bacillus atrophaeus</i>	Raíz	<i>Bacillus sp.</i>	97%
4 <i>Bacillus velezensis</i>	Raíz	<i>Bacillus sp.</i>	89.17%
5 <i>Bacillus sp.</i>	Raíz	<i>Bacillus sp.</i>	98.65%
8 T1 + <i>Bacillus subtilis</i>	Raíz	<i>Bacillus subtilis</i>	74.67%
9 T1 + T3	Raíz	<i>Enterobacter sp.</i>	86.03%
10 T1 + T4	Raíz	<i>Bacillus sp.</i>	97.43%
11 T1 +T5	Raíz	<i>Enterobacter sp</i>	89.31%
12 T1 + Micorroot	Raíz	<i>Enterobacter sp</i>	99.24%

Para la secuencia obtenida de la muestra del T1, el cual corresponde a *Azospirillum brasiliense*, según datos obtenidos y comparados en el Genbank no existe coincidencia. Sin embargo, existe una relación del 98% con *Pseudomonas sp.* Las bacterias del género *Pseudomonas* habitan una amplia variedad de ambientes y están consideradas como RPCV, siendo una excelente opción como inoculante de plantas, para mejorar el crecimiento vegetal y el manejo de sus enfermedades gracias a los metabolitos que son capaces de producir, lo cual las

hace idóneas para ser utilizadas como biofertilizantes en el ámbito agrícola (Sánchez y Guerra 2022).

Las secuencias para las cuales hubo relación en comparación con los datos obtenidos del Genbank, fueron los tratamientos 3, 4, 5, 6 y 10 tratados con distintas especies de *Bacillus* pertenecientes al grupo *sensu stricto* (Ash *et al.*, 1991). Debido a que es uno de los géneros más comunes encontrados en ecosistemas terrestres, cuando se encuentran dos o más especies de ellos en un mismo microambiente se generan consorcios microbianos, que traen como resultado mayor competitividad en la rizosfera y por consecuencia mayor densidad de población (Olanrewaju *et al.*, 2019). A esto podemos atribuir la prevalencia de este género en los diferentes tratamientos antes mencionados.

Para los tratamientos 9, 11 y 12 no existe coincidencia con los tratamientos aplicados, estos presentan una relación con *Enterobacter spp.* Dicho género es de vida libre y está presente en la mayoría de los suelos y aguas (Hernández *et al.*, 2011). Sin embargo, está clasificada como RPCV (Loredo *et al.*, 2004). Se relaciona con el incremento en la germinación, biomasa radical, rendimiento, entre otros (Hernández *et al.*, 2015).

Por otra parte, para todas aquellas bacterias que no prevalecieron en el sistema radical de la plata, se ha descrito que la rizosfera es un ambiente altamente competitivo para los microorganismos por la necesidad de obtener nutrientes (Raaijmakers *et al.*, 2002), Por lo tanto, aquellos organismos que sean altamente competitivos para colonizar y obtener nutrientes van a proliferar y,

posiblemente, ejercer un efecto en pro o en contra de la planta (Haas y Keel, 2003). Desafortunadamente, muchos de los estudios que pretenden emplear RPCV como bioinoculantes no resultan como se desearía, ya que dichas cepas no son competentes en la rizosfera o existe cierto antagonismo entre ellas, llegando a producir resultados no consistentes en campo (Kang *et al.*, 2014). Sin embargo, pocos trabajos dan seguimiento a experimentos de inoculación bacteriana en el análisis de sobrevivencia y competencia por colonizar espacios.

## V. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación se puede concluir que la biofertilización a partir de RPCV trae consigo beneficios para los cultivos, en este caso el maíz forrajero, no solo a nivel fenológico sino también en el rendimiento, coadyuva a una mejor absorción de nutrientes a nivel suelo-planta, ya que se observó una disminución en los niveles de los elementos esenciales (propiedades químicas) con los que contaba el suelo inicialmente, por lo que se puede deducir que las RPCV pusieron a disponibilidad de la planta los nutrientes ya presentes en el suelo.

Se acepta la hipótesis alterna ya que se detectó molecularmente en algunas de las muestras las bacterias inoculadas, y existió diferencia significativa entre los tratamientos con RPCV y su efecto en las propiedades fenológicas del cultivo. Además, existieron cambios en las propiedades químicas del suelo rizosférico. Aunque para el caso del rendimiento no se encontraron diferencias estadísticas significativas, numéricamente se obtuvieron buenos resultados

Sin embargo, es necesario implementar metodologías y un constante seguimiento, que aseguren la óptima proliferación de las RPCV con las que se pretende tratar o biofertilizar el cultivo. Esto para asegurar que los beneficios provienen directamente de los mecanismos de acción de las RPCV inoculadas, ya que debido a la gran cantidad de RPCV nativas presentes en el suelo, existen grandes posibilidades de que se vean desplazadas por la poca capacidad de competencia que estas pudieran llegar a tener en condiciones de campo.

En la Comarca Lagunera existen empresas que ofrecen productos de biofertilización a base de diferentes RPCV a bajos costos, sin embargo, es necesario seguir generando investigación para poder introducir de manera segura la aplicación de RPCV como alternativa de fertilización, esto para demostrar y convencer a los agricultores de los beneficios que trae consigo la biofertilización con RPCV.

## VI. LITERATURA CITADA

- Adeboye, M.K.A., E.N.O. Iwuafor y J.O. Agbenin. 2006. The effects of crop rotation and nitrogen fertilization on soil chemical and microbial properties in a Guinea Savanna Alfisol of Nigeria. *Plant Soil* 281: 97–107.
- Alarcón A., y R. Ferrera-Cerrato C. 2000. Biofertilizantes: Importancia y utilización en la agricultura. *Agr. Tec. Mex.* 26(2) 191-203.
- Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S., Collins, M.D. 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA. *Lett. Appl. Microbiol.* 13:202-6.
- Aslantas, R., R. Cakmakci, and F. Sahin. 2007. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on young apple tree growth and fruit yield under orchard conditions. *Sci. Hortic.* 111: 371-377.
- Ávalos de la Cruz, M. A., Figueroa Viramontes, U., García Hernández, J. L., Vázquez Vázquez, C., Gallegos Robles, M. A., & Orona Castillo, I. 2018. Bioinoculantes y abonos orgánicos en la producción de maíz forrajero. *Nova scientia*, 10(20), 170-189.
- Ayoub, I.; Bigatton, E.D.; Ballatore, A.; Gastaldi, N.; Berdini, A.; Archilla, M.V.; Bruno, M.A.; Pizzolitto, R.P.; Martín, M.P; Dubini, L.E.; Vázquez, C.; Merlo, C.; Lucini, E.I. 2022. Evaluación del efecto bioestimulante de bacillus spp como rizobacteria promotora del crecimiento vegetal sobre el cultivo de maíz (*Zea mays L.*). Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias

Agropecuarias. Microbiología Agrícola. Córdoba. Argentina. Volumen 10.  
Número 1.

Barea J. M. y Azcon-Aguilar C. 1982. La Rizosfera: interacciones microbio-planta.  
Anales de Edafología y Agrobiología XII (7-8) 1517-1532.

Bashan Y, Holguin G, Bashan LE. 2004. *Azospirillum*-plant relationships:  
physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-  
2003). Canad J Microbiol;(50):521-577

Bashan Y, Holguin G. 1997. *Azospirillum*/plant relationships: environmental and  
physiological advances (1990-1996). Can J Microb 43:103-121

Blaxter ML. 2004. The promise of a DNA taxonomy. Philos. Trans. R. Soc. Lond. (B  
Biol. Sci.) 359: 669-679

Blessing, D.; Hernandez, G. 2009. Comportamiento de variables de crecimiento y  
rendimiento en maíz (*Zea mays L.*) Var. NB-6 bajo prácticas de fertilización  
orgánica y convencional en la finca El Plantel 2007-2008. Universidad  
Nacional Agraria Facultad de Agronomía Departamento de Producción  
Vegetal

Bo S.; Likun, G.; Lijun, B.; Shiwei, Z.; Yingxue, W.; Zhihui, B.; Guoqiang, Z. and  
Xuliang, Z. 2020. Application of biofertilizer containing *Bacillus subtilis* reduced  
the nitrogen loss in agricultural soil. Soil Biol. Biochem. ISSN 0038-0717. Doi  
10.1016/j.soilbio.2020.107911.

Bohn, Hinrich; MCNEAI, Brian and O'Connor, George. 1985. Soil Chemistry. 2a ed.  
País: Alemania, Wiley-Interscience. Capítulo 9.

- Calvo, P. y D. Zúñiga. 2010. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). Ecol. Apl. 9: 31-39
- Carcaño-Montiel, M.G., Mascarúa-Esparza, M.A. & López Reyes, L. 2003. Producción y comercialización de inoculantes bacterianos en México.
- Calderón del Cid C. R. 2015. Estudio Del Efecto De Inoculación De Bacterias En Un Suelo Extremadamente Salino. Universidad de San Carlos de Guatemala
- Carvajal-Muñoz, J. S. y Mera-Benavides, A. C. 2010. Fertilización biológica: técnicas de vanguardia para el desarrollo agrícola sostenible. Producción + limpia. 5(2):77-96.
- Charles, M., B. Stuart, and W. Styles. 1999. Drip and micro irrigation for trees, vines and row crops. Design and management (with special sections on SDI). Irrigation Training and Research Center. California Polytechnic State University. San Luis Obispo, CA. USA.
- Chotte, J.L., Schwartzmann, A., Bally, R., and Monrozier, L.J. 2002. Changes in bacterial communities and Azospirillum diversity in soil fractions of a tropical soil under 3 or 19 years of natural fallow. Soil Biology and Biochemistry. 34: 1083- 1092.
- Cortés-Sánchez, A. de J., M. Díaz-Ramírez y M. P. Salgado-Cruz. 2017. *Bacillus cereus*: Alimentos, salud y biotecnología. Agroproductividad 10: 3-9

- De Araujo, F.F.; Souza, E.C.; Guerreiro, R.T.; Guaberto, L.M. y De Araujo, A.S.F. 2012. Diversity and growth-promoting activities of *Bacillus sp.* in maize. Revista Caatinga, Mossoro. 25(1): 1-7
- Delphine, L., A. Vidal, M. Smith, and J. Dauzat. 2005. More crop per drop: how to make it acceptable for farmers? Agric. Water Manage. 76: 108-119.
- Derás Flores H. 2015. Guía Técnica El Cultivo del Maíz. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura
- DNA/ RNA extraction & Qualification. Quality Control Platform of the CIT Program (Carte d'Identité de Tumeurs).
- Doorenbos, J. y A.H. Kassam. 1979. Efectos del agua sobre el rendimiento de los cultivos. Estudio FAO: Riego y Drenaje No. 33. FAO. Roma. 212 p
- Doran, J.W. and Parkin, T.B. 1994. Defining and Assessing Soil Quality. In: Doran, J.W., Coleman, D.C., Bezdicek, D.F. and Stewart, B.A., Eds., Defining Soil Quality for a Sustainable Environment, Soil Science Society of America Journal, Madison, Wisconsin, USA. 244 p. 3-21.
- Ferrera, C.R. y Alarcón, A 2008. Biotecnología de los hongos micorrízicos arbusculares. In: Díaz, F.A. Mayek, P.N. (eds.). La Biofertilización como Tecnología Sostenible. Plaza y Valdés, CONACYT. México. Pp:25-38.
- Ferreras, L. M., Gustavo, B. P., Kovalevski, E., & García, F. 2007. Indicadores de calidad física en suelos de la Región Pampeana Norte de Argentina bajo siembra directa. Ciencia del suelo, 25(2), 159-172.

- Fortis H., M., A. Rodante, J. A. Leos y E. Salazar S. 2002. El mercado de los derechos de agua en la Comarca Lagunera. *Políticas Agrícolas* 12: 103-122
- García Carrillo, M., Luna Ortega, J. G., González Torres, A., González Zamora, A., Gallegos Robles, M. Á., Vázquez Vázquez, C., Cervantes Vázquez, M. G. & González Salas, U. 2017. Relación de dieldrin y propiedades del suelo en la Comarca Lagunera, México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(8), 1691-1703.
- Genomic DNA Sample QC. Standard Operating Procedure. Joint Genome Institute (JGI).
- Glick BR. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol.* 1995; 41:109–117
- Granzin, B. (2004). Barley versus Maize As Supplements for Grazing Dairy Cows. New South Wales, Australia: DPI.
- Haas, D., & Keel, C. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual Review of Phytopathology*, 41, 117-153. doi: 10.1146/annurev.phyto.41.052002.095656
- Hatzinger, P.B. y M. Alexander. 1994. Relationships between the number of bacteria added to soil or seeds and their abundance and distribution in the rhizosphere of alfalfa. *Plant Soil* 158: 211-222.

- Hernández A, Caballero A Pazos M, Ramírez R, Heydrich M. 2003. Identificación de algunos géneros microbianos asociados al cultivo del maíz (*Zea mays L.*) de diferentes suelos de Cuba. *Revista Colombiana de Biotecnología*. (1):45-55.
- Hernández, F; Velásquez, K; Carreño, C; Lloclla, H; Estela, C; Altamirano, C. 2015. Efecto de enterobacterias en el desarrollo vegetativo de *Zea mays* en invernadero. UCV-HACER. *Revista de Investigación y Cultura*, vol. 4, núm. 1, enero-junio, pp. 10
- INEGI. 2007. Conjunto de Datos Vectorial Edafológico, escala 1: 250 000, Serie II (Continuo Nacional). México.
- INIFAP. 2014. Paquete tecnológico para la producción de maíz forrajero en chihuahua. Núm. 53. ISBN: 978-607-37-0276-8
- J. A. Montemayor-Trejo, J. Olague-Ramírez, M. Fortis-Hernández, R. Sam-Bravo, J.A. Leos Rodríguez, E. Salazar-Sosa, J. Castruita-López, J. C. Rodríguez-Ríos y J.A. Chavarría-Ga. 2007. Consumo de agua en maíz forrajero con riego subsuperficial. *Terra Latinoamericana*, vol. 25, núm. 2
- Jurado Guerra P., Lara Macias C. R., Saucedo Terán R. A. 2014. Paquete tecnológico para la producción de maíz forrajero en chihuahua. Centro de Investigación Regional Norte Centro Sitio Experimental La Campana Aldama, Chihuahua, Septiembre 2014 Folleto Técnico Núm. 53 ISBN: 978-607-37-0276-8

- Kang, Y., Shen, M., Yang, X., Cheng, D., & Zhao, Q. 2014. A plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) mixture does not display synergistic effects, likely by biofilm but not growth inhibition. *Microbiology*, 83(5), 666-673. doi: 10.1134/S0026261714050166
- Kenedy, A. 1999. The rhizosphere and spermosphere, 389-407 p. In: Sylvia, D.; Fuhrmann, J.; Hartel, P., and Zuberer, D., eds. Principles and applications of soil microbiology. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall. 499 p.
- Kloepper JW, Lifshitz R, Zablotowicz RM. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol* 7:39-49.
- Larson, W.E. & Pierce, F.J. 1991. Conservation and enhancement of soil quality. En: Evaluation for sustainable land management in the developing world. Proc. of the Int. Workshop on evaluation for sustainable land management in the developing world. Bangkok, Thailand. p. 175.
- Lipp, M., Bluth, A., Eyquem, F., Kruse, L., Schimmel, H., Van den Eede, G. 2001. Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organism in various processed foodstuff. *European Food Research Technology*, 212, 497–504
- Loredo, C.; López, L & Espinosa, D. 2004. “Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión”. *Terra Latinoamericana*, 22(2), 225-239.

MAGFOR- BOLETÍN COMERCIO AGROPECUARIO. Consultada 18 dic. 2008.

Disponible en. <http://www.magfor.gob.ni>

Marcos Serrano J. 2001. Simulación del índice de área foliar, materia seca y rendimiento de grano en maíz (*Zea mays* L.) bajo Ferti-Irrigación. UAAAN

Martens, DA & WT Frankenberger. 1992. Decomposition of bacterial polymers in soil and their influence on soil structure. *Biol. Fertil. Soils*. 13: 65-73.

Martínez R., Aguilar J. 2018. Biofertilización y fertilización química en maíz (*Zea mays* L.) en Villaflores, Chiapas, México.

Moreno Caselles, J.; Moral Herrero, R.; Pérez Murcia, M. D. y Pérez Espinosa, A. 2000. *Fundamentos de Edafología y Climatología*. Editor Universidad Miguel Hernández. España. 395 pp.

Morot-Gaudry JF. Nitrogen assimilation by plants. Physiological, biochemical and molecular aspects. Plymouth, RU: Science Publisher Inc: 2001. pp.343-368

Muleta D, Assefa F, Granhall U. 2007. In vitro Antagonism of Rhizobacteria Isolated from *Coffea arabica* L. against Emerging Fungal Coffee Pathogens. *Eng Life Sci*;7(6):577-86.

Murray, M. G. and Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*. 8(19):4321-4325.

NOM-021-RECNAT-2000 (NORMA Oficial Mexicana). 2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México, D. F.

- Núñez, H. G.; Peña, R. A.; González, C. F. F. y Faz, C. R. 2006. Características de híbridos de maíz de alta calidad nutricional de forraje. In: maíz forrajero de alto rendimiento y calidad nutricional. G. Núñez H. (Comp.) INIFAP-CIRNOC-CELALA. Libro científico núm. 13. 45-97 pp.
- Olanrewaju, O. S., & Babalola, O. O. 2019. Bacterial Consortium for Improved Maize (*Zea mays L.*) Production. *Microorganisms*. No. 11, Vol 7, pp. 1-19.
- Cuevas, F; Parra, Yanet. 2002. Potencialidades de *Azospirillum* Como Inoculante Para La Agricultura. *Cultivos Tropicales*, vol. 23, núm. 3, 2002, pp. 31-41 Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas La Habana, Cuba
- Pazos, M. 2000. Aislamiento e identificación de cepas nativas, pertenecientes al género *Azospirillum* mediante técnicas moleculares. [Tesis de maestría]. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. 50 h.
- Peña, H. Y Reyes, I. 2007. Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa L.*) *Interciencia* vol. 32 n.8.
- Perotti, E. B. R. y Pedello, A. 1999. En: Reunión Científica Técnica de Biología de Suelo, Fijación Biológica del Nitrógeno. (2:1999: Catamarca), p. 181-184
- Pii, Y., Mimmo, T., Tomasi, N., Terzano, R., Cesco, S. and Crecchio, C. 2015. Microbial Interactions in the Rhizosphere: Beneficial Influences of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Nutrient Acquisition Process. A Review. *Biology and Fertility of Soils*, 51: 403-415.

Prescott, L., Harley, J. and Klein, D. A. 1999. Microbiology. Boston: McGraw-Hill. 962

p

Raaijmakers, J. M., Vlami, M., & de Souza, J. T. 2002. Antibiotic Production by Bacterial Biocontrol Agents. *Antonie Van Leeuwenhoek* ,81, 537-547. doi:

10.1023/A:1020501420831

Reis, V. M.; Baldini, J. I.; Baldini, V. L. and Dobereiner, J. 2000. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees critical. *Reviews Plant Sciencies*. 3(19):227-247. Doi: 10.1080/07352680091139213.

Reyes, I. Alvarez, L. El-Ayuobi H. Valery A. 2008. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro* vol 20(1). Páginas 37- 48.

Roberto Ramírez Carvajal.1997. Propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos. SENA – SAC.

Rodicio MDR, Mendoza MDC. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 22: 238-245.

Ruiz C., J.A., G. Medina G., I. J. González A., H.E. Flores L., G. Ramírez O., C. Ortiz T., K.F. Byerly M y R.A. Martínez P. 2013. Requerimientos agroecológicos de cultivos. Segunda Edición. Libro Tecnico Núm. 3. INIFAP. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias-CIRPAC-Campo

Experimental Centro Altos de Jalisco. Tepatitlan de Morelos, Jalisco, México.  
ISBN:978-607-37-0188-4.

Salinas-García, JR; FM Hons & JE Matocha. 1997. Long-term effects of tillage and fertilization on soil organic matter dynamics. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 61: 152-159.

Sánchez Carrillo, Román, Priscila Guerra Ramírez. 2022. *Pseudomonas Spp.* Benéficas En La Agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 13, no. 4: 715–725

Sánchez, L. D. B.; Gómez, V. R. M.; Garrido, R. M. F. y Bonilla, B. R. R. 2012. Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 3(7):1401-1415.

Schippers, B., A.W. Bakker y A.H.M. Bakker. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25: 339-358

SEMARNAT y CP. 2003. Evaluación de la degradación del suelo causada por el hombre en la República Mexicana, escala 1: 250 000. Memoria Nacional 2001-2002

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2020 panorama Agroalimentario.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2021. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola

- Steenhoudt, O., y Vanderleyden, J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogenfixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiol. Rev. vol. 24, p. 487-506
- Tarrand, J. J.; Krieg, N. R. y Dobereiner, J. A. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Can. J. Microbiol., 1978, vol. 4, p. 967-980.
- Tejera-Hernández. Rojas-Badia. Heydrich-Perez. 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. Rev. CENIC. Vol. 42, núm. 3.
- Valenzuela-González, Fabiola, Casillas-Hernández, Ramón, Villalpando, Enrique, Vargas-Albores, Francisco, & Harris, Christine. (2015). El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. Ciencias marinas, 41(4), 297-313.
- Vásquez G., J. y Ruiz G., O. M. 1993. Influencia de cultivos antecesores y métodos de control de malezas sobre la cenosis de las malezas, crecimiento, desarrollo y rendimiento de los cultivos de maíz (*Zea mays L.*), Sorgo (*Sorghum bicolor L.*), Moench) y Pepino (*Cucumis sativus L.*). Tesis. UNA Managua-Nicaragua. P 75.
- Vessy, J. Kevin. 2003. "Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Biofertilizers". *Plant and Soil*. 255 (2): 571–586