

Bacterias promotoras de crecimiento de plantas autóctonas y su efecto en *Prosopis chilensis* (Molina) Stunz*

Native plant growth promoting bacteria and their effect on *Prosopis chilensis* (Molina) Stunz

Jorge Arnoldo Villegas-Espinoza¹, Edgar Omar Rueda-Puente², Bernardo Murillo-Amador³, María Esther Puente³, Francisco Higinio Ruiz-Espinoza¹, Sergio Zamora-Salgado¹ y Félix Alfredo Beltran Morales^{1§}

¹Departamento Académico de Agronomía- Universidad Autónoma de Baja California Sur. Carretera al sur km 5.5, A. P. 19-B, C. P. 23080. La Paz, Baja California Sur, México. Tel. (612) 123 88 00. Ext. 5518, 5507, 5110 y 5509. (jvillegas@uabcs.mx; fruiz@uabcs.mx; szamora@uabcs.mx). ²Universidad de Sonora, Campus Santa Ana, Carretera internacional y 16 de septiembre s/n, Santa Ana, Sonora, México. A. P. 84600. Tel. (662) 596 02 97. (erueda04@santana.uson.mx). ³Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. Mar Bermejo Núm. 195, Col. Playa Palo Santa Rita, La Paz, Baja California Sur. A. P. 23090. Tel. (612) 123 84 84. Ext. 3440 y 3354. (bmurillo04@cibnor.mx; epuente04@cibnor.mx). [§]Autor de para correspondencia: abeltran@uabcs.mx.

Resumen

En la actualidad se está deforestando en México la especie de *Prosopis* spp. para utilizarse como leña y carbón, en diferentes zonas áridas de nuestro país. Para su producción se utiliza fertilizante sintético, con ello hay un incremento de salinidad del suelo, subsuelo y mantos acuíferos. La presente investigación se realizó en Santa Ana, Sonora, México en 2006. Se aislaron y purificaron microorganismos asociados al sistema radicular de *Prosopis glandulosa* que se desarrolla en cráteres de la zona volcánica de la reserva de la biosfera El Pinacate y Gran Desierto de Altar Sonora. Las bacterias promotoras de crecimiento de plantas presentan la peculiaridad de fijar el nitrógeno atmosférico; se midió el efecto de las cepas aisladas en germinación y en el desarrollo en plántulas de *P. chilensis*. Fueron aisladas 19 colonias; de ellas, solamente una colonia bacteriana mostró alta actividad de reducción de acetileno y capacidad de solubilizar fosfatos, se identificó como *Bacillus amyloliquefaciens*. Nuestros resultados sugieren que *B. amyloliquefaciens*, presenta una afinidad particular para crecer de 0 a 0.75 M de NaCl y desarrollarse en temperaturas de 30 a 50 °C. Los efectos de la inoculación de *B. amyloliquefaciens*, conjuntamente con *A. halopraeferens*, mostraron resultados favorables en el incremento de la germinación y el desarrollo

Abstract

Today in Mexico are being deforested the species *Prosopis* spp. for use as firewood and charcoal, in various arid regions of the country. For its production a synthetic fertilizer is used, thus there is an increase in soil, groundwater and aquifers salinity. This research was conducted in Santa Ana, Sonora, Mexico in 2006. Were isolated and purified microorganisms associated with the root system of *Prosopis glandulosa* growing in craters of the volcanic area from El Pinacate and Gran Desierto de Altar, Sonora Biosphere Reserve. The plant growth-promoting bacteria present the peculiarity of fixing atmospheric nitrogen; the effect of the isolates on germination and seedling development in *P. chilensis* was measured. 19 colonies were isolated; of them, only one bacterial colony showed high acetylene reduction activity and ability to solubilize phosphate, was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. Our results suggest that *B. amyloliquefaciens*, has a particular affinity to grow from 0 to 0.75M of NaCl and develops at temperatures of 30 to 50 °C. The effects of inoculation of *B. amyloliquefaciens*, along with *A. halopraeferens*, showed favorable results in the increase of germination and seedling development of

* Recibido: enero de 2014
Aceptado: junio de 2014

de plántulas de *P. chilensis*. Éste es el primer reporte de *B. amyloliquefaciens* como bacteria promora de crecimiento de plantas asociada a *P. glandulosa*.

Palabras clave: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Azospirillum halopraeferens*, fijación de nitrógeno.

Introducción

Comunidades vegetales naturales están siendo inexorablemente perturbadas. Demandando una comprensión cada vez mayor de los mecanismos que operan en los ecosistemas naturales, de manera que las perturbaciones puedan ser manejadas para restaurar y estabilizar el medio ambiente (Agnew y Warren, 1996). Siendo el uso inapropiado de los fertilizantes sintéticos en diversos cultivos los causantes del incremento de la salinidad (Carrillo-García *et al.*, 1999; Carrillo, 2002; Carrillo *et al.*, 2002). Las alternativas de producción incluyen especies nativas y tolerantes a la salinidad (Carrillo *et al.*, 1998). Tal es el caso de estudios previos demuestran que la especie *P. chilensis* (Molina) Stunz Emend. Burkart, tolera altas concentraciones salinas (Felker *et al.*, 1981; Cazebonne *et al.*, 1999).

Esta especie se encuentra en el centro-sur del Perú y en el centro norte de Chile, suroeste de Estados Unidos de América y México (Burkart, 1976). Ésta especie de árbol es una importante fuente de combustible, material de construcción y forraje. La población local usa también la legumbre para su alimentación, especialmente en Argentina donde todavía en muchos almacenes se vende una pasta hecha con la vaina y la planta es utilizada en proyectos de reforestación (Solis y Espericueta, 2005; CONAFOR, 2008; FAO, 2013).

La importancia ecológica de esta especie radica en el medio ambiente como planta fijadora de nitrógeno, enriquece el suelo, promueve el crecimiento de matorrales asociados a ella y por tanto previene la erosión del suelo por su sistema radicular que ayuda a retener la humedad del suelo. *P. chilensis* es una especie importante de este género; asimismo, actúa como planta nodriza de numerosas especies de aves y roedores (INE, 1995; Carrillo *et al.*, 1998; Golubov *et al.*, 2001; Villegas-Espinoza *et al.*, 2010). Estos árboles son potencialmente importantes ya que pueden incorporarse en la reproducción en viveros, malla sombra y en invernaderos (Carrillo-García *et al.*, 1999). En otros lugares, hay un interés cada vez mayor por los efectos de fitorremediación

P. chilensis. This is the first report of *B. amyloliquefaciens* as a plant growth promoting bacteria associated with *P. glandulosa*.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Azospirillum halopraeferens*, nitrogen fixation.

Introduction

Natural plant communities are being inexorably disturbed. Demanding a growing understanding of the mechanisms operating in natural ecosystems, so that disturbances can be managed to restore and stabilize the environment (Agnew and Warren, 1996). Being the inappropriate use of synthetic fertilizers in different crops the source of the increase in salinity (Carrillo-García *et al.*, 1999; Carrillo, 2002; Carrillo *et al.*, 2002). Production alternatives include native species tolerant to salinity (Carrillo *et al.*, 1998). Previous studies show that the species *P. chilensis* (Molina) Stunz Emend. Burkart, tolerate high salt concentrations (Felker *et al.*, 1981; Cazebonne *et al.*, 1999).

This species is found in south-central Peru and northern central Chile, southwestern United States and Mexico (Burkart, 1976). This tree species is an important source of fuel, building materials and fodder. The local population also uses the legume for food, especially in Argentina where still many stores sell a paste made from the sheath and the plant is used in reforestation projects (Solis and Espericueta, 2005; CONAFOR, 2008; FAO, 2013).

The ecological importance of this species lies in the environment as nitrogen fixing plant, enriches the soil, promotes the growth of shrubs associated with it and thus prevents soil erosion by its root system that helps retain soil moisture. *P. chilensis* is an important species of this genus; also acts as a nurse plant for many species of birds and rodents (INE, 1995; Carrillo *et al.*, 1998; Golubov *et al.*, 2001; Villegas-Espinoza *et al.*, 2010.). These trees are potentially important because they can be incorporated into breeding nurseries, shade cloth and greenhouses (Carrillo-García *et al.*, 1999). In other places, there is a growing interest in the effects of phytoremediation that this genus shows to reduce salt levels in the soil and different pollutants caused by mining (Stove, 1997; Prasad, 2007; Solowey, 2007; Haque *et al.*, 2009; Mench *et al.*, 2010; Mani and Kumar, 2013).

que presenta este género de plantas por reducir niveles de sal presente en el suelo y diferentes contaminantes causados por la minería (Stove, 1997; Prasad, 2007; Solowey, 2007; Haque *et al.*, 2009; Mench *et al.*, 2010; Mani y Kumar, 2013).

Sin embargo, la producción de *P. chilensis* esta limitada por la falta de nitrógeno disponible en el suelo (Karlin *et al.*, 1997). Esta condición afecta el desarrollo y su potencial reproducción (Banwari y Rao, 1990; Akhavan *et al.*, 1991; Nahid y Gomah, 1991; Hahne y Schuch, 2004).

Diversos estudios relacionados con la interacción planta microorganismo en el género *Prosopis* spp., se limitan a estudios unicamente con micorrizas (Carrillo-Garcia *et al.*, 1999). Sin embargo, con relación a bacterias promotoras de crecimiento de plantas autóctonas de ambientes áridos salinos se destaca el de Villegas *et al.* (2008) con la especie *P. glandulosa*. Es importante aumentar el número de bacterias promotoras de crecimiento de plantas y además que sean tolerantes a la salinidad (Hamdi, 1999; Whipps, 2000).

La hipótesis planteada en el estudio fue: existen en el mezquite (*P. glandulosa*) bacterias promotoras de crecimiento de plantas y estas a su vez promueven el desarrollo en mezquite chileno (*P. chilensis*). De acuerdo a esto se plantearon los siguientes objetivos: 1) aislar, purificar e identificar bacterias promotoras de crecimiento de plantas; 2) medir el efecto de las bacterias aisladas en germinación y en el desarrollo en plántulas de *P. chilensis*; 3) determinar si, las bacterias promotoras de crecimiento de plantas presentan la capacidad de solubilizar fosfatos.

Materiales y métodos

Muestreo de raíces y suelo para aislamiento microbiano

El muestreo se realizó en los cráteres de la zona volcánica reserva de la biosfera El Pinacate y Gran Desierto de Altar Sonora, aproximadamente entre los meridianos 113° 15' y 133° 45' de longitud oeste y el paralelo 31° 30' y 32° 00' de longitud norte. Las muestras fueron colectadas de las raíces secundarias de la planta de *P. glandulosa* en la etapa de floración, se extrajeron cinco muestras (50 g) de cada uno de los cinco árboles muestreados las raíces fueron cortadas de un a dos cm (Puente *et al.*, 1999) y fueron puestas en el medio semi líquido Rennie (Rennie, 1981) se pusieron en agitación por 48 h a 30 °C, con una agitación de 150 rpm.

However, the production of *P. chilensis* is limited by the lack of available nitrogen in the soil (Karlin *et al.*, 1997). This condition affects the development and its reproduction potential (Banwari y Rao, 1990; Akhavan *et al.*, 1991; Nahid y Gomah, 1991; Hahne y Schuch, 2004).

Different studies related with the interaction plant-microorganism in the genus *Prosopis* spp., are limited to studies with mycorrhizal (Carrillo-Garcia *et al.*, 1999). However, regarding native plant growth-promoting bacteria of arid saline environments highlight the study of Villegas *et al.* (2008) with the species *P. glandulosa*. It is important to increase the number of plant growth-promoting bacteria and also being tolerant to salinity (Hamdi, 1999; Whipps, 2000).

The hypothesis for the study was: are there growth-promoting bacteria in mesquite (*P. glandulosa*) and does these in turn promote the growth in Chilean mesquite (*P. chilensis*). According to this the following objectives were proposed: 1) to isolate, purify and identify plant growth promoting bacteria; 2) measure the effect of the bacteria isolated in germination and seedling development in *P. chilensis*; and 3) determine whether plant growth-promoting bacteria have the ability to solubilize phosphates.

Materials and methods

Roots and soil sampling for microbial isolation

The sampling was made in the craters of the volcanic zone from El Pinacate and Gran Desierto de Altar Sonora Biosphere Reserve, approximately between the meridians 113° 15' and 133° 45' west longitude and parallel 31° 30' and 32° 00' north longitude. Samples were collected from secondary roots of the plant *P. glandulosa* in the flowering stage; five samples (50 g) of each of the five sampled trees were extracted and the roots were cut one to two cm (Puente *et al.*, 1999) and placed in a semi liquid medium Rennie (Rennie, 1981) placed under agitation for 48 h at 30 °C, at 150 rpm. The resulting solutions were diluted at 10⁻¹ six times in 0.85% saline solution to achieve a total dilution of 10⁻⁶. Three replications of the dilution of both mediums were dispersed in four concentrations of 0, 0.25, 0.5, and 0.75 M NaCl and poured in 12 plates containing the same liquid medium and solid free of nitrogen. The plates were incubated at 30 °C (12 plates) and 50 °C (12 plates) for four days.

Las soluciones resultantes fueron diluidas en 10^{-1} seis veces, en solución salina a 0.85%, para lograr la dilución total de 10^{-6} . Tres repeticiones de la dilución de ambos medios fueron dispersados en cuatro concentraciones de 0, 0.25, 0.5, y 0.75 M de NaCl se exparcieron en 12 placas conteniendo el mismo medio líquido y sólido libre de nitrógeno. Las placas fueron incubadas a 30 °C (12 placas) y 50 °C (12 placas) por cuatro días.

Cuatro gramos de suelo, fueron obtenidos de las muestras de raíz, se depósito en agua destilada estéril para su dilución (1:100 suelo: agua por volumen). Después cinco diluciones de 10^{-1} para tener un total de 10^{-5} , se obtuvo un volumen de 0.1 ml para depositarse en los medios libres de nitrógeno, en tres replicas, aplicándose en las placas con cuatro concentraciones de 0, 0.25, 0.5, y 0.75 M de NaCl. Las 12 placas fueron incubadas a 30 °C y 50 °C (Rueda-Puente *et al.*, 2010).

Identificación de la bacteria fijadora de nitrógeno

La caracterización molecular de las bacterias se desarrollo por medio del análisis por cromatografía de gases de ésteres metílicos de los ácidos grasos celulares (Sasser, 1990) y por secuenciación del 16SrRNA (ACCULAB, Newark, DE). Las identificaciones de las bacterias asignadas en este artículo se basan en el porcentaje de distancias genéticas (% GD), que se definen como el número de diferencias de nucleótidos entre las dos secuencias, expresado en porcentaje. Todas las secuencias de DNA se generaron usando PE Biosystems' MicroSeq 16S rRNA kit del gen MicroSeq 500 rDNA. Las muestras fueron identificadas usando el MicroSeq Software de Identificación Microbiana. El árbol filogenético fue generado utilizando el algoritmo unión de vecinos (Saitou y Nei, 1987). Todos los aislados de bacterias promotoras de crecimiento de plantas fueron almacenados en 15% de glycerol a -70 °C (Carrillo *et al.*, 1998).

Prueba de reducción de acetileno

Los cultivos puros fueron puestos en botellas apropiadas con los medios de cultivo semi líquido libres de nitrógeno OAB y Rennie en 0.5 M de NaCl, que se selló y se incubó a 30 °C durante cinco días. Después de la incubación, un ml de aire se extrajo con una jeringa y se inyectó un ml de acetileno. Se incubó el cultivo durante 48 h a 30 °C después de este procedimiento. Se realizaron cinco réplicas para validar los resultados se utilizó como control la cepa *A. halopraeferens* Au4T (Reinhold *et al.*, 1987) siendo una bacteria promotora de crecimiento de plantas ampliamente estudiada (De Troch

Four grams of soil were obtained from samples of root, mixed with sterile distilled water for dilution (1:100 soil: water by volume). After five dilutions 10^{-1} for a total of 10^{-5} , a volume of 0.1 ml was taken to poured in nitrogen-free mediums, in three replicates, applying on plates with four concentrations of 0, 0.25, 0.5 and 0.75 M NaCl. The 12 plates were incubated at 30 °C and 50 °C (Rueda-Puente *et al.*, 2010).

Identification of nitrogen-fixing bacterium

The molecular of characterization the bacteria was developed through gas chromatography of methyl esters of fatty acids (Sasser, 1990) and by sequencing the 16S rRNA (ACCULAB, Newark, DE). The identification of the bacteri assigned in this article are based on the percentage of genetic distances (% GD), defined as the number of nucleotide differences between two sequences, expressed in percentage. All DNA sequences were generated using PE Biosystems' MicroSeq 16S rRNA kit MicroSeq gene 500 rDNA. The samples were identified using the software MicroSeq Microbial identification. The phylogenetic tree was generated using the neighbor-joining algorithm (Saitou and Nei, 1987). All isolates of plant growth promoting bacteria were stored in 15% glycerol at -70 °C (Carrillo *et al.*, 1998).

Acetylene reduction test

Pure cultures were placed in appropriate bottles with semi liquid culture medium of nitrogen free OAB and Rennie in 0.5 M NaCl, sealed and incubated at 30 °C for five days. After incubation one ml of air was drawn with a syringe and injected one ml of acetylene. The culture was incubated for 48 h at 30 °C after this procedure. Five replications were performed to validate the results, as a control was used the strain *A. halopraeferens* Au4T (Reinhold *et al.*, 1987) being a plant growth promoting bacterium extensively studied (De Troch and Vanderleyden, 1996; Castellanos, 1998). The analysis of ethylene was performed by gas chromatography (Vary 6000, Vary Instrument Group, USA) equipped with a flame ionizator detector (Holguin *et al.*, 1992).

Determination of plant growth promoting bacteria in phosphate solubilization

Mineral degradation was evaluated qualitatively by visible observation and measuring the halo of solubilization; for this purpose each of the four isolates were inoculated on

y Vanderleyden, 1996; Castellanos, 1998). El análisis del etileno se realizó en cromatografía de gases (Vary 6000, Vary Instrument Group, USA) equipado con un detector de iones con flama de hidrógeno (Holguin *et al.*, 1992).

Determinación de las bacterias promotoras de crecimiento de plantas en la solubilización de fosfatos

La degradación mineral se evaluó cualitativamente por observación visible y medición del halo de solubilización; para ello cada una de las cuatro cepas aisladas fueron inoculadas en placas conteniendo medio SRSM (Sundara Rao y Siha, 1963) medio modificado por Vazquez *et al.* (2000) la siembra se realizó en placa por extensión en superficie e incubadas a 30 y 50 °C. La observación del crecimiento bacteriano y la medición del halo a producirse (evidenciado por la clarificación del medio ocasionada por la solubilización de mineral) se realizó a las 24 h. La capacidad de las bacterias aisladas para disolver fosfatos también fue cuantificada siguiendo la metodología reportada por Vazquez *et al.* (2000). Se realizaron cinco placas por repetición.

Más tarde, la determinación de la concentración de fosfato se determinó de acuerdo con el método estándar (Strickland y Parsons, 1972; Craven y Hayasaka, 1982). Se utilizó diseño experimental completamente al azar con un arreglo trifactorial 4*2*4 donde (4 bacterias, 2 temperaturas y 4 niveles de salinidad) con el fin de aplicar un análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias significativas se compararon entre las medias de los tratamientos fueron realizadas por la prueba de rango múltiple de Duncan a $p=0.05$. Los datos fueron analizados con el programa (SAS, 2001).

Evaluación de *B. amyloliquefaciens* como inoculante en la germinación de *P. chilensis* bajo estrés salino

El efecto de *B. amyloliquefaciens* en *P. chilensis* (Mol) Stunz., en la prueba de germinación, peso fresco y seco, altura y longitud radicular, utilizando como control *A. halopraeferens*. Utilizando la bacteria bajo las siguientes concentraciones de 0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl. Durante el verano (junio-julio) de 2006 se colectaron vainas maduras de árbol de mezquite chileno (*P. chilensis*), ubicado en la ciudad de Santa Ana, Sonora (paralelo 30° 33' latitud norte y 111° 07' longitud oeste del meridiano Greenwich, 548 msnm). Posteriormente las vainas se depositaron en un recipiente térmico o hielera a 4 °C. Las semillas se homogenizaron en base a tamaño y apariencia.

plates containing medium SRSM (Sundara Rao and Siha, 1963) modified by Vázquez *et al.* (2000) spreading was performed in plate by extension on surface and incubated at 30 to 50 °C. The observation of bacterial growth, and halo measurement (as evidenced by the clarification of the medium caused by the solubilization of mineral) was made at 24 h. The ability of bacterial isolates to dissolve phosphate was quantified using the methodology reported by Vázquez *et al.* (2000). Five plates per replication.

Later, the determination of phosphate concentration was determined according to the standard method (Strickland and Parsons, 1972; Craven and Hayasaka, 1982). The experimental design was completely randomized with a trifactorial arrangement 4*2*4 (4 bacteria, 2 temperatures and 4 levels of salinity) in order to apply an analysis of variance (ANOVA). Significant differences were compared between means of treatments and were performed by the multiple range test of Duncan $p=0.05$. The data was analyzed with (SAS, 2001) program.

Evaluation of *B. amyloliquefaciens* as inoculant in the germination of *P. chilensis* under salt stress

The effect of *B. amyloliquefaciens* in *P. chilensis* (Mol) Stunz, in the germination test, fresh and dry weight, height and root length, using as control *A. halopraeferens*; using bacteria under the following concentrations 0, 0.25, 0.5 and 0.75 M NaCl. During the summer (June-July) of 2006; mature pods of Chilean mesquite (*P. chilensis*) located in the city of Santa Ana, Sonora (latitude 30° 33' north latitude and 111° 07' west longitude of Greenwich meridian, 548 masl) were collected. Subsequently the pods were deposited in a thermal container or cooler at 4 °C. The seeds were homogenized according to size and appearance.

Seeds were washed with tap water following the criteria of buoyancy, discarding those that floated. Subsequently the water was discarded and added a disinfectant called Tween 20, 2% and remained like that for 10 minutes under constant stirring at a speed of 150 rpm using an agitator EBERBACH. The seeds were inoculated in liquid according to (Carrillo *et al.*, 1998). Before inoculation, the seeds were treated by scarification of hot water at a temperature of 75 °C for four minutes, this was done to break dormancy in seeds, and favor germination percentage.

Se lavaron en agua potable siguiendo el criterio de flotabilidad, desechando aquellas que flotaron. Posteriormente se desechó el agua y se adicionó un desinfectante denominado Tween 20, al 2% y se mantuvo así durante 10 minutos en agitación constante a una velocidad de 150 revoluciones por minuto (rpm) utilizando una agitadora marca EBERBACH. Las semillas fueron inoculadas en líquido de acuerdo a (Carrillo *et al.*, 1998). Antes de realizar la inoculación las semillas fueron tratadas por escarificación de agua caliente a una temperatura de 75 °C por cuatro minutos esto se realizó para romper la latencia en las semillas y favorecer el porcentaje de germinación.

Las pruebas de germinación se realizaron en placas de Petri estériles, utilizándose como sustrato una tela de (150 * 15 mm) cubriendo la parte interior de la caja petri. Las placas fueron humedecidas con cantidades uniformes de solución de 0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl. Los tratamientos se colocaron en una cámara de germinación en condiciones de luz blanca-continua, 27 °C ± 0.5 °C y a 35% ± 1% de humedad relativa. Aplicándose 20 ml de agua destilada estéril, así como también la solución salina e inoculates. El porcentaje de germinación fue evaluado mediante la observación de la emergencia de la radícula. El número de semillas germinadas se realizó mediante lecturas diarias y finalmente el porcentaje de germinación fue determinado a los 20 días.

El diseño experimental utilizado fue un arreglo bifactorial 3 x 4 considerando dos factores aleatorios, cada uno con cinco réplicas de 10 semillas cada uno. Considerando como primer factor el inoculante teniendo tres niveles: el no inoculado, el inoculado con la bacteria *B. amyloliquefaciens* y el inoculado con *A. halopraeferens*. El Segundo factor conteniendo las cuatro concentraciones de 0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl. Resultando en 12 tratamientos. Los datos del porcentaje de germinación total fueron analizados, después de llevar a cabo la transformación de los valores en arcoseno (Sokal y Rohlf, 1988), con el fin de aplicar un análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias significativas se compararon entre las medias de los tratamientos fueron realizadas por la prueba de rango múltiple de Duncan a $p=0.05$. Los datos fueron analizados con el programa (SAS, 2001). 35 plántulas fueron elegidas de cada tratamiento al azar; se midió el crecimiento de las plántulas, peso fresco y seco en 20 días. La longitud de la raíz y la altura fueron medidas con la utilización de un bernier digital (GENERAL No. 143, General Tools Manufacturing Co., Inc. New York). El peso seco se determinó después de cada plántula secada en una secadora de aire forzado a 110 °C por 36 h.

Germination tests were made in sterile petri plates, using as substrate a fabric (150 * 15 mm) covering the inside of the petri dish. The plates were wetted with solutions of uniform amounts of 0, 0.25, 0.5 and 0.75 M NaCl. The treatments were placed in a germination chamber under continuous light, 27 °C ± 0.5 °C and 35% ± 1% relative humidity. Applying 20 ml of sterile distilled water, as well as the saline solution and inoculates. Germination percentage was evaluated by observing the emergence of the radicle. The number of germinated seeds was measured daily and finally the percentage of germination was determined at 20 days.

The experimental design was a bifactorial arrangement 3 x 4 considering two random factors, each with five replicates of 10 seeds each. Considering the first factor the inoculant having three levels: uninoculated, inoculated with the bacterium *B. amyloliquefaciens* and inoculated with *A. halopraeferens*. The second factor contains four concentrations of 0, 0.25, 0.5 and 0.75 M NaCl; resulting in 12 treatments. The data of total percentage of germination were analyzed, after transforming the values in arc cosine (Sokal and Rohlf, 1988), in order to apply the analysis of variance (ANOVA). Significant differences were compared between means of treatment and performed by the multiple range test Duncan $p=0.05$. The data was analyzed with the (SAS, 2001) program. 35 seedlings were selected randomly from each treatment; seedling growth, fresh and dry weight was measured at 20 days. The root length and height were measured by using a digital Bernier (General No. 143, General Tools Manufacturing Co., Inc. New York). The dry weight was determined after each seedling was dried in a forced air dryer at 110 °C for 36 h.

Quantification of bacteria attached to the root system of *P. chilensis* was performed at the end of the study 20 days later. Seven seedlings from each treatment were used and washed with sterile distilled water and immersed for one minute in an Eppendorf tube. The tubes were shaken for a minute to separate the bacteria from the root. Three samples of 100 µL of the resulting solution of the tubes were taken and spread on petri dishes by dispersing the solid medium Rennie free nitrogen and incubated for 24 h at 30 °C and 50 °C, the colony forming units (CFU) were quantified. CFU were subjected to an analysis of variance (ANOVA), F-test was applied to determine the values of significant differences (Snedecor, 1956). Significant differences were compared between means treatment and performed by the multiple range test Duncan $p=0.05$. All tests were performed using the statistical program SAS (SAS, 2001).

La cuantificación de las bacterias adheridas al sistema radicular de *P. chilensis* se realizaron al finalizar el estudio 20 días después. Se utilizaron siete plántulas de cada tratamiento y fueron lavadas con agua destilada estéril y fueron sumergidas durante un minuto dentro un tubo Eppendorf. Los tubos se agitaron por un minuto para separar las bacterias de la raíz. Se tomaron tres muestras de 100 μL de la solución resultante de los tubos y se sembraron en cajas petri por dispersión conteniendo el medio sólido Rennie libre de nitrógeno y encubadas por 24 h a 30 °C y 50 °C, se cuantificaron las unidades formadoras de colonias (CFU). Las CFU se les realizó un análisis de varianza (ANOVA), la prueba-F fue aplicado para determinar los valores de diferencias significativas (Snedecor, 1956). Las diferencias significativas se compararon entre las medias de los tratamientos, fueron realizadas por la prueba de rango multiple de Duncan a $p=0.05$. Todas las pruebas se realizaron con el programa estadístico SAS (SAS, 2001).

Resultados y discusión

Identificación de las bacterias promotoras de crecimiento de plantas

Sólo cuatro microorganismos con alta actividad de reducción de acetileno fueron identificados con dos pruebas bioquímicas: 1) ácidos grasos metil ésteres (FAMES), y 2) por medio de la secuenciación del 16S ribosomal RNA (Figura 1). Los resultados presentan una afinidad de 96.2% que identifica a *B. amyloliquefaciens*, que se desarrolla en suelo y agua, asociada con plantas, y tiene la capacidad de fijar nitrógeno acorde con lo reportado por (Vázquez *et al.*, 2000).

Durante el análisis de reducción de acetileno, sólo una especie de los 19 aislados presentaron actividad en la reducción de acetileno siendo la especie *B. amyloliquefaciens* con 6.28 ± 0.46 nmol del cultivo⁻¹ h⁻¹, en contraste con el control *A. halopraeferens*, con 7.2 ± 1.5 nmol cultivo⁻¹ h⁻¹. Los cuatro géneros bacterianos con una mayor actividad en la reducción de acetileno después de *B. amyloliquefaciens* fueron *Kocuria polaris* (6.01 ± 0.25 nmol cultivo⁻¹ h⁻¹), *Planococcus antarcticus* (5.79 ± 0.51 nmol cultivo⁻¹ h⁻¹), y *Rhododoccus fascians* (5.13 ± 0.76 nmol cultivo⁻¹ h⁻¹). Se observó que las 19 colonias fueron incapaces de reducir el acetileno en grandes cantidades en comparación con el control *A. halopraeferens*. Esto se debe a la dependencia de otras bacterias (Holguin *et*

Results and discussion

Identification of plant growth-promoting bacteria

Only four microorganisms with high acetylene reduction activity were identified with two biochemical tests: 1) fatty acid methyl esters (FAMES), and 2) by sequencing 16S ribosomal RNA (Figure 1). The results show an affinity of 96.2% identical to *B. amyloliquefaciens*, which grows in soil and water, associated with plants, and has the ability to fix nitrogen according with that reported by (Vazquez *et al.*, 2000).

During the analysis of acetylene reduction, only one specie of the 19 isolates showed activity in reducing acetylene being the species *B. amyloliquefaciens* with 6.28 ± 0.46 nmol culture⁻¹ h⁻¹, in contrast to control *A. halopraeferens* with 7.2 ± 1.5 nmol culture⁻¹ h⁻¹. The four bacteria genus with higher activity in acetylene reduction after *B. amyloliquefaciens* were *Kocuria polaris* (6.01 ± 0.25 nmol culture⁻¹ h⁻¹), *Planococcus antarcticus* (5.79 ± 0.51 nmol culture⁻¹ h⁻¹), and *Rhododoccus fascians* (5.13 ± 0.76 nmol culture⁻¹ h⁻¹). It was observed that the 19 colonies were unable to reduce acetylene in large amounts compared to the control *A. halopraeferens*. This is due to the dependence of other bacteria (Holguin *et al.*, 1992; Rojas *et al.*, 2001). Further studies show that *B. amyloliquefaciens* has the ability to fix nitrogen, produce plant hormones and phosphate solubilization (Zexun and Wei, 2000).

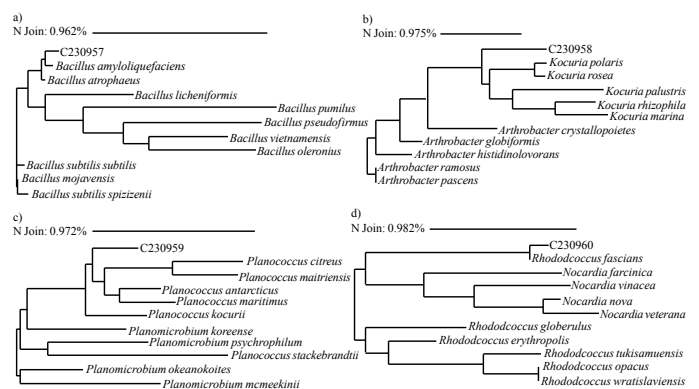


Figura 1. Árbol filogenético del 16S rRNA secuenciado de las bacterias aisladas de rizósfera *P. glandulosa*. a) *B. amyloliquefaciens*; b) *Kocuria polaris*; c) *Planococcus antarcticus*; y d) *Rhododoccus fascians*.

Figure 1. Phylogenetic tree of 16S rRNA sequence of bacteria isolated from rhizosphere *P. glandulosa*. a) *B. amyloliquefaciens*; b) *Kocuria polaris*; c) *Planococcus antarcticus*; and d) *Rhododoccus fascians*.

al., 1992; Rojas *et al.*, 2001). Además hay estudios que demuestran que *B. amyloliquefaciens* tiene la capacidad de fijar nitrógeno, producir fitohormonas y solubilizar fosfatos (Zexun y Wei, 2000).

Determinación de las bacterias promotoras de crecimiento de plantas en la solubilización de fosfatos

Después de 18 h de incubación, las cuatro bacterias fueron capaces de disolver el fósforo insoluble. Sin embargo, en la solubilización de fosfato entre las especies estudiadas, *B. amyloliquefaciens*, presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) comparada con los otros géneros en estudio (*Kocuria polaris*, *Planococcus antarcticus*, y *Rhodococcus fascians*), considerando la salinidad a 0, 0.25 y 0.75 M de NaCl a 30 y 50 °C (Cuadro 1). Lo contrario ocurrió a una concentración de 0.5 M de NaCl a 30 °C donde *Rhodococcus fascians* presentó altos valores, mientras a 50 °C fue *Planococcus artarcticus*. Estas especies de bacterias sometidas a diversas temperaturas se desarrollaron a 30 y 50 °C, ya que es su medio natural del que fueron aisladas se presentan temperaturas altas (INE, 1995).

Cuadro 1. Solubilización de fosfatos de las bacterias de rizósfera de *P. glandulosa* bajo concentraciones de salinidad y temperatura. Las comparaciones fueron realizadas en columnas aplicándose análisis de varianza (ANOVA), utilizando la prueba de rango multiple de Duncan.

Table 1. Phosphate Solubilization of bacteria from rhizosphere of *P. glandulosa*, under low concentrations of salinity and temperature; comparisons were made in columns applying an analysis of variance (ANOVA) using the multiple range test of Duncan.

Bacterias	Salinidad (NaCl)							
	0 M		0.25 M		0.5 M		0.75 M	
	30°	50°	Temperatura y tamaño del halo (mm)				30°	50°
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	4 a	3.67 a	4 a	2 a	0.67 c	1 b	1.87 a	1.67 a
<i>Rhodococcus fascians</i>	1 d	1.67 c	1.3 d	1.33 c	2 a	0.33 c	1 b	1.33 b
<i>Kocuria polaris</i>	1.33 c	3.33 b	1.67 c	1.67 b	1.33 b	1 b	0.33 c	1 c
<i>Planococcus artarcticus</i>	2.33 b	1.67 c	2.67 b	1.33 c	0.67 c	1.33 a	0 d	1.33 b

Los valores representan las medias de cinco repeticiones.

De acuerdo a la solubilización de fosfatos las cuatro especies de bacterias solubilizan fosfatos en el medio de cultivo contenteniendo fosfato de calcio insoluble, la mayor solubilización fue a las 16 h después de la incubación. Entre las especies de bacterias tratadas, *Planococcus antarcticus* mostró actividad solubilizadora. Sin embargo, *B. amyloliquefaciens* redujo la actividad de solubilización con el aumento de salinidad (Cuadro 1).

Determination of plant growth promoting bacteria in phosphate solubilization

After 18 h of incubation, the four bacteria were able to dissolve the insoluble phosphorus. However, phosphate solubilization among studied species, *B. amyloliquefaciens*, showed significant differences ($p < 0.05$) compared to the other genus (*Kocuria polaris*, *Planococcus antarcticus* and *Rhodococcus fascians*), considering salinity at 0, 0.25 and 0.75 M NaCl at 30 and 50 °C (Table 1). The opposite occurred at a concentration of 0.5 M NaCl at 30 °C where *Rhodococcus fascians* have high values, while at 50 °C was *Planococcus artarcticus*. These species of bacteria under various temperatures were grown at 30 and 50 °C, since their natural environments present high temperature (INE, 1995).

According to phosphate solubilisation the four species of bacteria solubilize phosphate in the culture medium containing insoluble calcium phosphate; the greater solubilisation was at 16 h after incubation. Among the species bacteria treated, *Planococcus antarcticus* showed solubilizing activity. However, *B. amyloliquefaciens* reduced the solubilization activity with an increase of salinity (Table 1).

Evaluation of *B. amyloliquefaciens* as inoculant in germination of *P. chilensis* under salt stress

When *B. amyloliquefaciens* was inoculated during the germination stage and using as control *A. halopraeferens*, the results showed significant differences between treatments (Figure 2). Also, it was observed that the increasing salinity of 0.25 M NaCl and inoculation of the bacteria studied favor the germination of *P. chilensis*. Seeds inoculated with

Evaluación de *B. amyloliquefaciens* como inoculante en la germinación de *P. chilensis* bajo estrés salino

Cuando se inoculó *B. amyloliquefaciens* durante la etapa de germinación, y usando como control *A. halopraeferens*, los resultados mostraron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 2). Además, se observó que el incremento de la salinidad a 0.25 M de NaCl y la inoculación de las bacterias en estudio favorecen la germinación para *P. chilensis*. Las semillas inoculadas con *A. halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens* germinaron 20% más aproximadamente a 0 M de NaCl. Los tratamientos con mayor salinidad afectaron negativamente el porcentaje de germinación, independientemente estando presentes las bacterias (Figura 2).

Por otra parte, la fijación de nitrógeno es influenciada por las bacterias y con ello promoviendo el desarrollo y mostrando diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 2) para los dos resultados medidos (altura de planta y longitud del sistema radicular). Los tratamientos con *B. amyloliquefaciens* promovieron el crecimiento de las plántulas, y presentaron un mayor número de células bacterianas adheridas a las raíces con *B. amyloliquefaciens* también se aprecia una declinación bacteriana de las unidades formadoras de colonias (CFU) con el incremento de la salinidad (Cuadro 2).

A. halopraeferens and *B. amyloliquefaciens* germinated approximately 20% more to 0 M NaCl. Treatments with higher salinity negatively affected the germination percentage; regardless of bacteria (Figure 2).

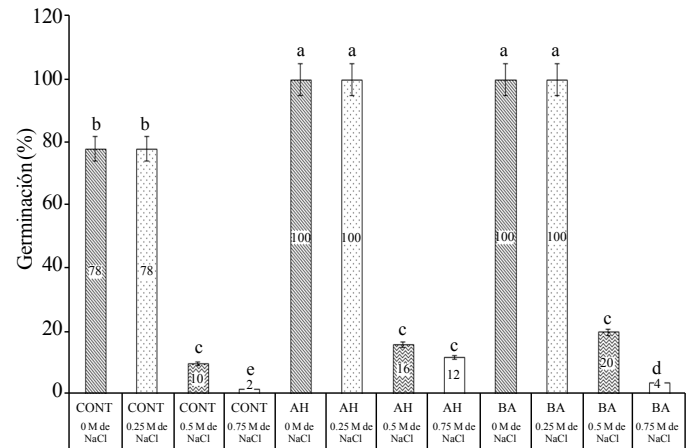


Figura 2. Efecto de germinación de *P. chilensis* donde CONT: Control, BA: *B. amyloliquefaciens* y HA: *A. halopraeferens* bajo cuatro concentraciones de NaCl en germinación *P. chilensis*. Las barras indican el error estándar de la media y el número dentro de las barras es el porcentaje de germinación.

Figure 2 Effect of germination in *P. chilensis* where CONT: Control, BA: *B. amyloliquefaciens* and HA: *A. halopraeferens* under four concentrations of NaCl in germination of *P. chilensis*. The bars indicate the standard error of the mean and the number inside the bars is the percentage of germination.

Cuadro 2. Efecto de *B. amyloliquefaciens* y *A. halopraeferens* en plántulas de *P. chilensis* con cuatro concentraciones de NaCl. Table 2. Effect of *B. amyloliquefaciens* and *A. halopraeferens* in seedlings of *P. chilensis* with four concentrations of NaCl

Inoculante	Salinidad M de NaCl	Altura de planta (cm)	Longitud radicular (cm)	Peso fresco (mg)	Peso seco (mg)	UFC
control	0	4.88 c	5.38 b	0.3 a	0.06 a	0d
control	0.25	4.26 cd	4.36 d	0.33 a	0.07 a	0d
control	0.5	1.28 g	1.35 f	0.07 c	0.01 bc	0d
control	0.75	0.09 i	0.03 g	0.01 e	0 d	0d
<i>A. halopraeferens</i>	0	6 a	5.39 b	0.32 a	0.06 a	3817a
<i>A. halopraeferens</i>	0.25	5.48 b	4.88 c	0.35 a	0.07 a	3392b
<i>A. halopraeferens</i>	0.5	2.3 f	1.82 e	0.17 b	0.03 b	2333c
<i>A. halopraeferens</i>	0.75	0.35 h	0.11 g	0.04 c	0.01 bc	3420b
<i>B. amyloliquefaciens</i>	0	6.03 a	5.59 a	0.33 a	0.07 a	3900a
<i>B. amyloliquefaciens</i>	0.25	5.32 b	4.78 c	0.32 a	0.06 a	2467c
<i>B. amyloliquefaciens</i>	0.5	3.06 dc	2.24 e	0.17 b	0.03 b	2063c
<i>B. amyloliquefaciens</i>	0.75	0.2 h	0.05 g	0.02 d	0 d	2217c

Los promedios seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes a $p=0.05$. Comparaciones se realizaron dentro de las columnas mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan. Los valores representan las medias de cinco repeticiones. Bacteria (1×10^8 UFC ml⁻¹).

Sin embargo, la longitud del sistema radicular se incrementó con *B. amyloliquefaciens* con una diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con *A. halopraeferens* sólo en el control y en la concentración de 0.5. Ésta especificidad de la asociación planta-bacteria probablemente es controversial en bacterias de vida libre, ya que influyen en la simbiosis entre los microorganismos, plantas y con ello se estimula el crecimiento de las plantas indirectamente (Kloepper *et al.*, 1989).

Para llevar a cabo el desarrollo de la especie *P. chilensis*, se asume que esta especie podría beneficiarse de las bacterias promotoras de crecimiento de plantas presentes en la rizósfera (Holguin *et al.*, 1992; Vázquez *et al.*, 1999). En este sentido, otros microorganismos como las actinorrizas se asocian con las raíces de *Prosopis* (Ferrari y Wall, 2004) como también *Azsorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (Martínez-Scott *et al.*, 2002).

Evaluación de inoculantes en germinación y crecimiento de plántulas

Estudios de germinación se han llevado a cabo con el género *Prosopis* spp. (Sosa *et al.*, 2005; Villagra y Bruno, 2005; Reginald *et al.*, 2007). Sin embargo, resultados mostrados por las bacterias promotoras de crecimiento de plantas en condiciones de salinidad no se han reportado. *P. chilensis* puede beneficiarse de *B. amyloliquefaciens* y *A. halopraeferens*, según resultados obtenidos. Aunque se han realizado estudios con plantas y otros microorganismos benéficos, se han observado efectos inhibitorios sobre la germinación (Díaz *et al.*, 2001). Sin embargo, otros estudios reportan efectos positivos (Puente y Bashan, 1993; Puente *et al.*, 1999; Puente, 2004; Villegas-Espinoza *et al.*, 2010). Los efectos positivos de las bacterias sugieren la producción de sustancias que promueven el desarrollo de la planta (El-Khawwas y Adachi, 1999).

Conclusiones

La germinación de *P. chilensis* es afectado negativamente por la salinidad. Sin embargo, la inoculación de las bacterias *A. halopraeferans* y *B. amilyolyquefasciens* mitigan ese efecto negativo, promoviendo la germinación de la semilla

Furthermore, nitrogen fixation is influenced by bacteria and thereby promoting the development and showing significant differences between treatments (Table 2) for the two results measured (plant height and length of the root system). Treatments with *B. amyloliquefaciens* promoted growth of seedlings and showed an increased number of bacterial cells adhered to the roots of *B. amyloliquefaciens*, is appreciated also a decline of bacterial colony forming units (CFU) with increasing salinity (Table 2).

However, the length of the root system increased with *B. amyloliquefaciens* with a significant difference ($p < 0.05$) compared to *A. halopraeferens* only in control and in the concentration of 0.5. This specificity of plant-bacteria association is probably controversial in free-living bacteria, since they influence the symbiosis between microorganisms, plants and thus plant growth is stimulated indirectly (Kloepper *et al.*, 1989).

To carry out the development of species *P. chilensis*, it is assumed that this species could benefit from the plants growth promoting bacteria present in the rhizosphere (Holguin *et al.*, 1992; Vázquez *et al.*, 1999). In this regard, other microorganisms like actinorhizal associated with the roots of *Prosopis* (Ferrari and Wall, 2004) also *Azsorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* and *Rhizobium* (Martínez-Scott *et al.*, 2002).

Evaluation of inoculants in germination and seedling growth

Germination studies were conducted with *Prosopis* spp. (Sosa *et al.*, 2005; Villagra and Bruno, 2005; Reginald *et al.*, 2007). However, results shown by the plant growth-promoting bacteria under salinity conditions have not been reported. *P. chilensis* can benefit from *B. amyloliquefaciens* and *A. halopraeferens*, according to results. Although studies have been conducted with plants and other beneficial organisms, it has been observed inhibitory effects on germination (Díaz *et al.*, 2001). However, other studies report positive effects (Puente and Bashan, 1993, Bridge *et al.*, 1999; Puente, 2004; Villegas-Espinoza *et al.*, 2010). The positive effects of bacteria suggest the production of substances that promote plant growth (El-Khawwas and Adachi, 1999).

y subsecuente en etapa de plántula. Es posible la utilización de bacterias promotoras de crecimiento de plantas halotolerantes con potencial para ser utilizadas en reforestación. Es importante mencionar que este tipo de trabajo pone como alternativa la posible utilización de estos microorganismos beneficiosos como potencial de ser utilizados como biofertilizantes. Sin embargo los estudios de asociación de *B. amyloliquefaciens* y *A. halopraeferens* con la especie *P. chilensis*, se recomienda llevar a cabo más estudios de la interacción planta-bacterias promotoras de crecimiento de plantas.

La utilización de las bacterias promotoras de crecimiento de plantas halotolerantes son un potencial para utilizarse en zonas áridas, ya que las altas concentraciones de sales en el agua presentan un problema y debido que el género *Prosopis* spp., es un árbol que se desarrolla en suelos salinos, puede contribuir al manejo de dichas zonas (Velarde *et al.*, 2003). *Prosopis* puede ser utilizado para la agricultura principalmente, donde hay una posibilidad para el desarrollo de gestión de inversión sostenible de los bosques para reforestar áreas dañadas. También se puede utilizar como un cultivo de alimentos y semillas oleaginosas. Al mismo tiempo, el género *Prosopis* como cultivo ayudaría a equilibrar zonas desérticas. Siendo un método biológico confiable basado en bacterias benéficas, y contribuir con la fertilidad de los suelos.

Agredecimientos

Este trabajo fue apoyado por el Fondo Sectorial de Investigación en Materia Agrícola, Pecuaria, Acuicultura, Agro-biotecnología y Recursos Filogenéticos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional Forestal y la Universidad de Sonora, por el proyecto 14651: "Bacterias Promotoras del Crecimiento de Plantas Asociadas a Ambientes Árido Salinos y su Efecto en la Reproducción de Mezquite Sonorense y Chileno". Universidad Autónoma de Baja California Instituto de Ciencias Agrícolas y al Departamento Académico de Agronomía de la Universidad Autónoma de Baja California Sur.

Literatura citada

Agnew, C. and Warren, A. 1996. A framework for tackling drought and land degradation. *J. Arid Environ.* 33:309-320.

Conclusions

Germination of *P. chilensis* is negatively affected by salinity. However, the inoculation of bacteria *A. halopraeferans* and *B. amyloliquefaciens* mitigate this negative effect, promoting seed germination and subsequently seedling stage. It is possible the use of plant growth promoting bacteria halotolerant with potential for use in reforestation. It is noteworthy that this kind of work places as possible alternative the use of these beneficial microorganisms as potential biofertilizers. However association studies of *B. amyloliquefaciens* and *A. halopraeferans* with the species *P. chilensis*, it is recommended to conduct further studies of the interaction plant-growth-promoting bacteria.

The use of plant growth-promoting bacteria halotolerant are a potential to be used in arid regions, since high concentrations of salts in water present a problem and because the genus *Prosopis* spp., is a tree that grows in saline soils, it may contribute to the management of this zones (Velarde *et al.*, 2003). *Prosopis* can be used for agriculture mainly where there is a possibility for the development of sustainable investment management of forests to reforest damaged areas. It can also be used as a food crop and oilseeds. At the same time, *Prosopis* genus as a crop would help balance desert areas. Being a reliable biological method based on beneficial bacteria, and contributes to soil fertility.

End of the English version



- Akhavan, K.; Campbell, W.; Jurinak, J. and Dudley, L. 1991. Effects of CaSO₄, CaCl₂, and NaCl on leaf nitrogen, nodule weight, and acetylene reduction activity in *Phaseolus vulgaris* L. *Arid Soil Res. Rehabilitation.* 5:97-103.
- Banwari, I. and Rao, V. 1990. Effect of *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen content of *Cynodon dactylon* under different moisture regimens. *Indian J. Plant Physiol.* 33:210-213.
- Burkart, J. 1976. A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae subfam. Mimosoideae). *J. Arnold Arbor.* 440-525 pp.
- Carrillo, A. 2002. Efecto de *Azospirillum brasilenses* en Cardón. Tesis de Maestría en Uso Manejo y Preservación de los Recursos Naturales. Colombia y Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, BCS. México. 98 pp.
- Carrillo, A.; Li, C. and Bashan, Y. 2002. Increased acidification in the rhizosphere of cactus seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Naturwissenschaften.* 89:428-432.
- Carrillo, A.; Puente, M.; Castellanos, M. T. and y Bashan, Y. 1998. Aplicaciones biotecnológicas de ecología microbiana. *In: Pontificia Universidad Javeriana, Santa Fe de Bogotá, Colombia and Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste Manual de Laboratorio* (Eds.). *Manual de Laboratorio.* La Paz, B.C.S., México. 15-20 pp.

- Carrillo-García, A.; Leon de la Luz, J.; Bashan, Y. and Bethlenfalvay, G. 1999. Nurse plants, mycorrhizae, and plant establishment in a disturbed area of the Sonoran desert. *Res. Ecol.* 7:321-335.
- Castellanos, T. 1998. Respuesta de la superficie de la bacteria promotora de crecimiento de plantas *Azospirillum* spp. a estímulos externos. Tesis Doctoral. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, BCS, México. 7-8 pp.
- Cazabonne, C.; Vega, A.; Varela, D. and Cardemil, A. 1999. Salinity effects on germination and growth of *Prosopis chilensis*. *Revista Chilena de Historia Natural.* 72:83-91.
- Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). 2008. El mezquite, un norteño bien plantado. *Revista CONAFOR.* 90:1-3.
- Craven, P. A. and Hayasaka, S. S. 1982. Inorganic phosphate solubilization by rhizosphere bacteria in a *Zostera marina* community. *Can J. Microbiol.* 28:605-610.
- De Troch, P. and Vaderleyden, J. 1996. Surface properties and motility of *Rhizobium* and *Azospirillum* in relation to plant root attachment. *Microbiol. Ecol.* 32:149-169.
- Díaz, V.; Ferrera, C.; Almaraz, S. and Alcántar, G. 2001. Inoculation of plant growth-promoting bacteria in lettuce. *Terra.* 19:327-335.
- El-khawas, H.; and Adachi, K. 1999. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effects on rice roots. *Biol. Fertil. Soils.* 29:377-381.
- FAO. 2013. Manual sobre taxonomía de *Prosopis* en México, Perú y Chile. <http://www.fao.org/docrep/006/q2580s/q2580s07.htm>.
- Felker, P.; Clark, P. R.; Laag, A. E. and Pratt, P. F. 1981. Salinity tolerance of tree legumes; mesquite (*Prosopis glandulosa* var. *Torreyana*, *P. velutina* and *P. articulata*), algarrobo (*P. chilensis*), kiawe (*P. pallida*) and tamarugo (*P. tamarugo*) grow in sad culture on nitrogen-free media. *Plant Soil.* 61:311-317.
- Ferrari, A. E. y Wall, L. G. 2004. Utilización de árboles fijadores de nitrógeno para la revegetación de suelos degradados. *Rev. Fac. Agron.* 105(2):63-87.
- Golubov, J.; Mandujano, M. C. and Eguiarte, L. 2001. Mesquite invasive nightmare or biodiversity enhancers. *Bol. Soc. Bot. Mex.* 69:21-28.
- Hahne, K. and Schuch, U. 2004. Nitrogen requirements of *Prosopis velutina* during early seedling growth. Turgrass and Ornamental Research Report College of Agriculture & Life sciences, University of Arizona, Tucson, Arizona, USA. Available at website <http://cals.arizona.edu/pubs/crops/az1359/>.
- Hamdi, H. 1999. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 63:968-989.
- Haque, N.; Peralta-Videa, J. R.; Duarte-Gardea, M. and Gardea-Torresdey, J. L. 2009. Differential effect of metals/metalloids on the growth and element uptake of mesquite plants obtained from plants grown at a copper mine tailing and commercial sedes. *Bio. Technol.* 100(24):6177-6182.
- Holguin, G.; Guzman, M. and Bashan, Y. 1992. Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees: isolation, identification and in vitro interaction with rhizosphere *Staphylococcus* sp. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiol. Ecol.* 101:207-216.
- Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT (INE). 1995. Programa de Manejo de 2 Áreas Naturales Protegidas Reserva de la Biosfera de El Pinacate y Gran Desierto de Altar: INE. 74 p.
- Karlin, U.; Coirin, R.; Catalan, L. and Zapata, R. 1997. *Prosopis chilensis* en FAO n° 12. Serie: Zonas Áridas y Semiáridas. Especies Arbóreas y Arbustivas para las Zonas Áridas y Semiáridas de América Latina. 72 p.
- Klopper, J. W.; Lifhitz, R. and Zablotowicz, R. M. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7:39-44.
- Mani, D. and Kumar, C. 2013. Biotechnological advances in bioremediation of heavy metals contaminated ecosystems: an overview with special reference to phytoremediation. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 13:299-308.
- Martínez-Scott, M. M.; Hernández-Hernández, V.; Palomo-Gil, A. y Vásquez-Arroyo, J. 2002. Diversidad Genética de rhizobia asociada a cuatro leguminosas arbóreas del Noreste de México. *Rev. Chapingo Serie Zonas Áridas* 3:9-18.
- Mench, M.; Lepp, N.; Bert, V.; Schwitzguébel, J. J.; Gawronski, S. W.; Schröder, P. and Vangronsveld, J. 2010. Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and Outlook from COST action 859. *J. Soils Sediments.* 10:1039-1070.
- Nahid, S. and Gomah, A. 1991. Response of wheat to dual inoculation with *Va-mycorrhiza* and *Azospirillum* fertilized with NPK and irrigated with sewage effluent. *Arid. Soil Res. Rehabilitation.* 5:83-96.
- Prasad, M. N. V. 2007. Phytoremediation in India. *Phytorem. Methods Biotechnol.* 23(4):435-454.
- Puente, M. 2004. Poblaciones bacterianas endófitas y del rizoplaneo de plantas del desierto degradadas de roca y su efecto sobre el crecimiento del cardón (*Pachycereus pringlei* [S. WATS] BRITT. & ROSS). Tesis Doctoral. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, BCS, México. 166 p.
- Puente, M. and Bashan, Y. 1993. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strains on germination and seedling growth of the giant columnar cardon cactus (*Pachycereus pringlei*). *Symbiosis.* 15:49-60.
- Puente, M.; Holguin, G.; Glick, B. and Bashan, Y. 1999. Root-surface colonization of black mangrove seedlings by *Azospirillum halopraeferens* and *Azospirillum brasilense* in seawater. *Microbiol. Ecol.* 29:283-292.
- Reginald, V.; Avin, P. and Sakina, A. 2007. Copper tolerance to germination in mesquite, a potential tree species for restoring mined-lands in Oman. *J. Agric. Food Environ. Sci.* 1:1-13.
- Reinhold, B.; Hurek, T.; Fendrik, I.; Pot, B.; Gillis, M.; Kersters, K.; Thielmans, S. and De Ley, J. 1987. *Azospirillum halopraeferens* sp. novo a nitrogen-fixing organism associated with roots of *Kallar grass (Leptochloa fusca* L. Kunth). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:43-51.
- Rennie, R. 1981. A single medium for the isolation of acetylene reducing (dinitrogen-fixing bacteria from soil). *Can. J. Microbiol.* 27:8-14.
- Rojas, A.; Holguin, G.; Glick, B. and Bashan, Y. 2001. Synergism between *Phyllobacterium* sp (N_2 -fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere. *Microbiol. Ecol.* 35:181-187.
- Rueda-Puente, E. O.; Castellanos-Cervantes, T.; Díaz de León-Álvarez, J. L.; Preciado-Rangel, P. and Almaguer-Vargas, G. 2010. Bacterial community of rhizosphere associated to the annual halophyte *Salicornia bigelovii* (Torr.). *Terra Latinoamerica.* 28:345-353.

- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- SAS Institute. 2001. SAS/STAT User's Guide. Version 6.12 SAS Institute, Cary, NC.
- Sasser, M. 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. *In: Clement, Z. (Ed.) Methods in Phytobacteriology.* Akademiai RU Kiado, Budapest. 565 p.
- Snedecor, G. 1956. Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology. Freeman & Co (Ed.). The Iowa State College Press, Ames, I. A. 237-290 pp.
- Sokal, R. and Rohlf, F. 1988. *Biometry In: the principles and practice of statistics in biological research.* Ed Sokal R. Freeman & Co San Francisco. 859 p.
- Solis, G. y Espericueta, M. 2005. Utilización y aprovechamiento del mezquite (*Prosopis*) en Sonora. *Biocencia. Rev. Div. Cienc. Biol. Salud.* Universidad Autónoma de Sonora. 11 p.
- Solowey, E. 2007. Phytoremediation of soil deficiencies in arid and saline area by nitrogen fixing arboreal legumes. *In: Golan, A. (Ed.) Nutrient biofortification and exclusion of pollutants in food plants, COST Action 859.* Ben-Gurion University of the Negev, Sede-Boqer Campus, Israel. 54 p.
- Sosa, L.; Llanes, A.; Reinoso, H.; Reninato, M. and Luna, V. 2005. Osmotic and specific ion effects on the germination of *Prosopis strombulifera*. *Ann. Bot.* 96:261-267.
- Stove, K. 1997. Report of the environment protection authority in cooperation with the department for environment, heritage and aboriginal affairs natural resources council. Environment and Natural Resources Information Center (Ed.). Adelaide, South Australia. 11-16 pp.
- Sundara-Rao, W. and Sinha, M. 1963. Phosphate dissolving microorganisms in the soil and rhizosphere. *Indian J. Microbiol.* 41:999-1011.
- Vázquez, P.; Holguin, G.; Puente, M.; López, C. and Bashan, Y. 1999. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol. Fertil. Soils.* 30:460-468.
- Vázquez, P.; Holguin, G.; Puente, M.; López-Cortes, A. and Bashan, Y. 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Bio Fertil Soils.* 30:460-468.
- Velarde, M.; Felker, P. and Degano, C. 2003. Evaluation of Argentine and Peruvian *Prosopis* germplasm for growth at seawater salinities. *J. Arid Environ.* 55:515-531.
- Villagra, P. and Bruno, J. 2005. Effects of salinity on the establishment and early growth of *Prosopis argentina* and *Prosopis alpacato* seedlings in two contrasting soils: Implications for their ecological success. *Austral Ecol.* 30:325-335.
- Villegas-Espinoza, J. A.; Rueda-Puente, E. O.; Murillo-Amador, B.; Puente, M. E.; Grimaldo-Juárez, O.; R.; Avilés-Marín, S. M. y Ponce-Medina, J. F. 2010. Efecto de la inoculación de *Azospirillum halopraeferens* y *Bacillus amyloliquefaciens* en la germinación de *Prosopis chilensis*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems.* 12:19-32.
- Villegas-Espinoza, J. A.; Rueda-Puente, E. O.; Puente, M. E.; Muñoz-Salazar, R.; Avilés-Marín, S. M.; Grimaldo-Juárez, O.; Murillo-Amador, B. and Preciado-Rangel, P. 2008. First report of plant growth promoting bacteria from mesquite (*Prosopis glandulosa*) rhizosphere on volcanic soils of Sonora desert. 12 International Symposium on Microbial Ecology. Cairns Australia 15-25 agosto. 1419 p.
- Whipps, J. 2000. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52:487-511.
- Zexun, I. and Wei, S. 2000. Effect of cultural conditions on IAA biosynthesis by *Klebsiella oxytoca* SG-11. *Chinese J. Appl. Environ. Biol.* 6:66-69.