



CENTRO DE INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**ESTUDIO DE LA FENOLOGÍA Y POTENCIAL
PRODUCTIVO DE LA HALOFITA *Salicornia bigelovii*
(Torr.) CON LA ASOCIACIÓN DE BACTERIAS
FIJADORAS DE NITRÓGENO**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los
Recursos Naturales
(Orientación en Ecología)

P r e s e n t a

Edgar Omar Rueda Puente

La Paz, B.C.S. Diciembre de 2003

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 25 del Mes de noviembre del 2003, se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., para revisar la Tesis de Grado titulada:

"ESTUDIO DE LA FENOLOGÍA Y POTENCIAL PRODUCTIVO DE LA HALÓFITA *Salicornia bigelovii* (Torr.) CON LA ASOCIACIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO"

Presentada por el alumno:

Edgar Omar Rueda Puente

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Ecología**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

DRA. THELMA CASTELLANOS CERVANTES
DIRECTOR DE TESIS

DR. JOSÉ LUIS DÍAZ DE LEÓN ÁLVAREZ
CO-TUTOR

DR. ENRIQUE TROYO DIÉGUEZ
DIRECTOR DE TESIS

DR. JOSÉ LUIS LEÓN DE LA LUZ
CO-TUTOR

DR. BERNARDO MURILLO AMADOR
REVISOR

DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CONFORMACIÓN DE COMITÉ

La presente tesis fue dirigida por:

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes	Agricultura en Zonas Aridas. CIBNOR
Dr. Enrique Troyo Diéguez	Agricultura en Zonas Aridas. CIBNOR

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes	Agricultura en Zonas Aridas. CIBNOR
Dr. Enrique Troyo Diéguez	Agricultura en Zonas Aridas. CIBNOR
Dr. José Luis Díaz de León Alvarez	Departamento de Agronomía. Universidad Autónoma de Baja California Sur
Dr. José Luis León de la Luz	Planeación ambiental y conservación. CIBNOR
Dr. Edward Glenn	Universidad de Arizona

El comité de tesis y sinodales estuvo integrado por:

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes	Agricultura en Zonas Aridas. CIBNOR
Dr. Enrique Troyo Diéguez	Agricultura en Zonas Aridas. CIBNOR
Dr. José Luis Díaz de León Alvarez	Departamento de Agronomía. Universidad Autónoma de Baja California Sur
Dr. José Luis León de la Luz	Planeación ambiental y conservación. CIBNOR
Dr. Bernardo Murillo Amador	Agricultura en Zonas Aridas. CIBNOR

RESUMEN

La halófito *Salicornia bigelovii* es un recurso vegetal con alto potencial de ser aprovechado en las zonas costeras del noroeste de México; sin embargo, su productividad depende de la aportación suplementaria de nitrógeno, así como de otros macro y micro nutrientes esenciales.

La fijación de nitrógeno por bacterias asociadas a raíces de *Salicornia bigelovii* y halófitas parece ser un proceso común en los ecosistemas de marisma. Sin embargo, la diversidad a nivel rizósfera es desconocida. Cinco áreas alrededor de la Bahía de La Paz en Baja California Sur, México, fueron muestreadas para aislar bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a esta halófito: obteniéndose 18 aislamientos bacterianos. Una de las bacterias mostró alta actividad de reducción de acetileno y fue identificada como *Klebsiella pneumoniae*. Los efectos de *K. pneumoniae* se evaluaron en diferentes etapas vegetativas de *S. bigelovii*: germinación y estado de plántula de dos genotipos de *S. bigelovii* (genotipo silvestre y cv. 'SOS-10'), comparándola con la bacteria halotolerante *Azospirillum halopraeferens*. Durante la germinación y etapa de plántula, *K. pneumoniae* mostró una especificidad alta para el genotipo silvestre, mientras que *A. halopraeferens* fue más específico para el genotipo mejorado SOS-10.

Por otra parte, los mismos genotipos se evaluaron bajo condiciones de campo y cuando se inocularon, mostraron un aumento en algunas de las variables del desarrollo y crecimiento, tales como germinación, longitud de planta, características bioquímicas, incluyendo la proteína total, ceniza y lípidos en algunas partes de la planta. Los resultados indican que los rendimientos de ambos genotipos de *S. bigelovii*, bajo condiciones de campo, son mejorados por la aplicación de *K. pneumoniae* y *A. halopraeferens*.

Este es el primer informe de *Klebsiella pneumoniae* como una bacteria fijadora de nitrógeno asociada a *Salicornia bigelovii*.

Palabras Clave: Halófitas, *Salicornia bigelovii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Azospirillum halopraeferens*, bacterias fijadoras de nitrógeno.

ABSTRACT

The halophyte *Salicornia bigelovii* is vegetal with high potential to be improved in the sea coasts of the northwest in México; however, its productivity depend of the nitrogen aportation, and others macro and micro nutrients essentials.

Nitrogen-fixation by bacteria associated to the roots of *Salicornia bigelovii* and similar halophytes is an important source of available nitrogen in salt marsh ecosystems. However, the diversity of *Salicornia*'s rhizosphere is unknown. Five areas around the Bay of La Paz in Baja California Sur, Mexico were sampled to detect nitrogen-fixing bacteria associated to this halophyte: where 18 colonies were isolated. Only one showed high acetylene reduction activity. The bacterium was identified as *Klebsiella pneumoniae*. Effects of *K. pneumoniae* were evaluated at the germination and early seedling growth stages of two genotypes of *S. bigelovii* ('wild genotype' and cv. 'SOS-10'). This bacterium, in conjunction with *Azospirillum halopraeferens*, was tested for growth-promoting ability when inoculated on *S. bigelovii* genotypes under several saline concentration conditions. During germination and early seedling growth, *K. pneumoniae* showed high specificity for the wild *S. bigelovii* genotype, while *A. halopraeferens* was more specific for the SOS-10 *S. bigelovii* genotype.

On the other hand, the growth and development of the same two genotypes of *S. bigelovii*, were evaluated under field conditions. When inoculated with previously selected and cultivated native strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Azospirillum halopraeferens*, these inoculants increased some growth and development parameters, using measures of weight, length of plants, and biochemical characteristics, including total protein, ash, and total lipid content in selected plant parts. The findings suggest that yields of both genotypes of *S.*

bigelovii, under field conditions, can be improved by the application of *K. pneumoniae* or *A. halopraeferens* strains.

This is the first report of *Klebsiella pneumoniae* as nitrogen-fixing bacterium associated to the halophyte *Salicornia bigelovii*.

Key words: Halophytes, *Salicornia bigelovii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Azospirillum halopraeferens*, Nitrogen-fixing bacterium.

DEDICATORIA

Qué sería de mi vida sin Tí, **Señor Mío.....**

GRACIAS ETERNAMENTE.

Seres con entrega incondicional en todos los momentos y aflorando lo más íntimo de su ser para Todos y cada uno de los que le rodean.....**Es cuando uno debe meditar, reflexionar y actuar cargando en lo más entrañable de uno:**

QUE LA VIDA, HAY QUE VIVIRLA BIEN

Gracias Mami (Bertha Gloria Puente de Rueda)

A Ti, que mediante el Ejemplo has manifestado Tu Amor.....PARA DESPUÉS HACERLA VALER CON LOS QUE NOS ACOMPAÑAN Y EN LOS QUE VIENEN.

Gracias Papi (Gilberto Rueda de León)

Manifestando mi amor y Deseándoles por siempre:

LO MEJOR DE LA VIDA A MIS HERMANOS (AS):

**Dulce María, Priscila Berenice, Gloria Cecilia, Indra Araceli,
Jorge Erick y su (nuestra) familia: Yadira, Erick y Viridiana.**

**QUE PUEDE UNO DECIR, CUANDO MUCHAS PERSONAS HAN INFLUIDO
POSITIVAMENTE EN TÍ?..... GRACIAS!!!!**

Tía Mague, Tío Tomás, Tía Lupe, Tío Benjamín, Tía Lucha, Tío Fco., Tío Bocho, Tía Bertha, Tío Darío, Tía Arcelia, Tío Luis, Tía Camila, Tío Tomás, Tía Rita, Tío Rogelio, Tía Juanita, Tío Raúl, Tía Martha, Tía Emma y demás Familia de mi madre y padre.

DEDICATORIA (continuación)

Familia Sánchez Cuellar y Romero Rueda. GRACIAS!!!!!! POR ESTAR JUNTOS.

Aún cuando la vida nos haya alejado físicamente, estaremos juntos...

Abuelitos (Don Darío (t), Leonor (t) e Isabel (t));

Javier Rueda (t), Ismael Rueda (t), Jorge de León (t), Juan (t), Profe Alfredo (t)..

A MIS GRANDES AMIGOS DESDE LA INFANCIA:

**RENE SÁNCHEZ, JOSE LUIS SÁNCHEZ, JORGE ADAME,
PEQUE ADAME, TOMAS ALONSO, ALEJANDRO ALONSO,
DANIEL ALONSO, MARIO RUEDA, SAUL RUEDA,
ALBERTO RUEDA, ALFREDO RUEDA, SERGIO RUEDA,
OSCAR RUEDA, JORGE ERICK RUEDA.**

Siempre es bueno infundir el deseo de superación en los niños:

Dulce María, Erick, Viridiana, Joel, Sarahí.....

Deseando lo mejor en Ti.....y perpetuar nuestro Amor: Alejandra

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), beca escolar no. 70548 y Centro de Investigación Biológicas del Noroeste (proyecto BIVE3 y AGE4) por brindarme su apoyo para la realización de la presente investigación.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., que a través de sus Programas de Posgrado y de Zonas Áridas, tuve la oportunidad de desarrollarme para alcanzar esta meta y tener la base ante la posibilidad del quehacer científico.

Mi más sincero agradecimiento a los miembros del Comité Tutorial, Revisores de tesis y Sinodales: Dra. Castellanos Cervantes Thelma, por confiar en mí, brindarme sus conocimientos, apoyo, comprensión y sumergirme en el mundo de los microorganismos fijadores de nitrógeno. Al Dr. Troyo Diéguez Enrique, por su apoyo, confianza y asesoría en el presente estudio y el caminar andado. Al Dr. Díaz de León Álvarez José Luis, investigador de la Universidad Autónoma de Baja California Sur, por su apoyo, confianza, tiempo disponible y excelentes asesorías del quehacer científico, Gracias por esa paciencia. Al Dr. León de la Luz José Luis, por sus acertadas sugerencias y opiniones en la elaboración del presente trabajo. Al Dr. Glenn Edward (aunque no tuve el gusto de conocerlo) por su apoyo en su momento oportuno y al Dr. Murillo Amador Bernardo, por su excelente apoyo en el asesoramiento y cómplice de mis metas de este estudio, Gracias por su amistad. A la Dra. Lilia Alcaraz, que desinteresadamente contribuyó al enriquecimiento de un servidor y en esta investigación. Finalmente a todos por contribuir en mi formación académica de los últimos años, por sus apoyos y asesoramientos para mejorar la calidad de los artículos científicos, y del presente manuscrito de tesis, gracias por su dedicación y valioso tiempo.

Al Sr. Julio Peralta por brindarme su confianza en el material vegetativo disponible para realizar la presente investigación (semilla SOS-10).

Al personal de los diferentes laboratorios de análisis del CIBNOR que apoyaron en las evaluaciones experimentales y/o asesorando en las diferentes técnicas desarrolladas: Ernesto Díaz, Alejandro Amador, Manuel Trasviña (Edafología), Sonia Rocha y Dolores Rondero (Bromatología), Iván Murillo (Biogeoquímica), Diana Carreño (Bioquímica fisiológica), Carmen (Histología e Histoquímica), Norma Ochoa (Diagnóstico microbiológico), Pedro (Bioensayos de especies marinas), Ariel C. Villacorta, Lilia Ibarra, Olivia Arjona (Cromatografía de gases), Laura Carreón, Jorge del Ángel (Cromatografía de ácidos grasos), Francisco González (Cromatografía líquida), Baudilio (Lab. Espectrofotometría), Arturo Sánchez,.....que desinteresadamente contribuyeron con mucho en la realización de la investigación.

A la Dra. Berta Arredondo, M.C. Laura Carreón y cDr. Jorge Arturo del Ángel, por brindarme su espacio y conocimientos de su línea de investigación.

Al personal de Laboratorio de cómputo y de Información: Horacio Sandoval, José Manuel Melero, Horacio Goytortuga, Esther, Edgar Yuen, Ana María, Antonio Díaz.

AGRADECIMIENTOS (continuación)

A todo el equipo de la dirección de Posgrado del CIBNOR, quienes me orientaron y me indicaron los procedimientos correctos para concluir satisfactoriamente mi doctorado y de quienes recibí fondos para reunir a mi comité de examen Predoctoral. En especial a la Lic. Osvelia Ibarra, Lic. Leticia González, Paty y la Sra. Lupita.

A mis compañeros de laboratorio de microbiología (M.C. Manuel, M.C. Juan Pablo, c.Dra. Esther Puente, M.C. Adriana, M.C. Paty, M.C. Alejandro Amador, c.Dra. Estela de Bashan, Dra. Gina Holguin, Dra. Hilda, Dr. Yoav Bashan, Dr. Alejandro López, Dr. Macario Bacilio, Dr. Levsky, Dra. Arevick, QBP's: Marvin, Migdalia, Nohemí, Luis y Orlando), quienes sensibilizados con microorganismos fijadores de nitrógeno tienen la amabilidad de transmitir sus conocimientos a un servidor.

Al personal investigador del Programa de Zonas Áridas (Dr. Bernardo Murillo, Dr. Juan Larrinaga, Dr. José Luis García, c.Dra. Alejandra Nieto, c.Dr. Hector Fraga, M.C. Lidia Hiraes, Dr. Raúl López), por su Amistad y apropiadas observaciones hacia un servidor.

Al personal administrativo del Programa de Zonas Áridas (Verónica Hiraes y Silvia Virgen).

A mis compañeros de estudio: Itzel, Javier Carabeo, Vania Serrano, Adriana Muhlia, Ruben, Herbey, Julio Peralta, Lourdes Morquecho, Renato, Laura Rivera, Laura Celis.....

A Jaime Holguin, Dr. Edilmar Cortés, Dr. Antonio Luna, Dr. Ángel Campa, Dr. Gabriel, Dr. Ricardo Vázquez, Dr. Pedro Cruz, Roberto Carlos, Carlos Sáenz, Sergio Soto, Rosalío Maldonado, María de Jesús Romero, Erick, Fabiola, Alfonso Medel y Blanca, por esa disponibilidad de tiempo y conocimientos proporcionados hacia un servidor.

Al personal de promoción y Difusión (CIBNOR): Reina Rubí, al de Imprenta (CIBNOR): Santiago Rodríguez y Rubén Andrade.

Lic. Guadalupe Murillo, Lic. Sergio Sevilla, Sra. Rosalía Servín, Sr. Magallón, cDra. Esther Puente y Lic. Silvia Alzaga (CIBNOR), por el apoyo y confianza en mi recibimiento por primera vez y durante, en La Paz, B.C.S.

Al Instituto de la Juventud y el Deporte de Baja California Sur (CREA), con gratitud a las autoridades C. Guadalupe Ortega Geraldo y Profesor J. Salvador González González, quienes me sensibilizaron una vez más en mi andar, la importancia de un hogar, facilitándome las instalaciones del CREA fueran MI PRIMERA CASA en la Paz, B.C.S. (alrededor de un año). GRACIAS!!!!!!.

A todas aquellas personas que de una u otra manera colaboraron para culminar exitosamente el presente trabajo de investigación y que no son citados en el presente manuscrito.

CONTENIDO

	Página
CONFORMACIÓN DE COMITÉ.....	II
RESUMEN.....	III
ABSTRACT	V
DEDICATORIA	VII
AGRADECIMIENTOS	IX
CONTENIDO	XI
PREFACIO	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIV
ÍNDICE DE TABLAS	XVI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XVIII
1. ANTECEDENTES	1
2. INTRODUCCIÓN.....	4
2.1. <i>SALICORNIA</i> SPP.....	5
2.1.1. <i>Salicornia bigelovii</i>	5
2.1.3. Manejo en cultivo: nivel experimental.....	7
2.2. BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO.....	8
2.3. <i>AZOSPIRILLUM</i> SPP	10
3. OBJETIVO GENERAL.....	13
3.1. OBJETIVOS PARTICULARES	13
4. HIPÓTESIS	14
5. SECUENCIA EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA.....	15
5.1. AISLAMIENTO Y DETECCIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO EN LA RIZÓSFERA DE <i>SALICORNIA BIGELOVII</i> (TORR.) EN LA BAHÍA DE LA PAZ, B.C.S., SU CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MEDIANTE TÉCNICAS DE CULTIVO Y ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO EN LA CONFORMACIÓN DE CADENA SIMPLE DE DNA (SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM: SSCP).....	15
5.1.1. Área de muestreo y colecta de <i>S. bigelovii</i>	15
5.1.2. Aislamiento de microorganismos asociados a la rizósfera de <i>S. bigelovii</i>	17
5.1.3. Selección y purificación de los microorganismos.....	18
5.1.4. Determinación de la capacidad de fijación de nitrógeno por las bacterias aisladas	18
5.1.5. Colección de cepas endémicas de la rizósfera de <i>S. bigelovii</i>	19
5.1.6. Caracterización de bacterias	19
5.1.7. Perfil de la población bacteriana no cultivable asociada a rizósfera de <i>Salicornia bigelovii</i> mediante el análisis del polimorfismo en la conformación de cadena simple de DNA (single strand conformation polymorphism: SSCP)	20
5.2. EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> EN LA GERMINACIÓN DE LA HALOFITA COSTERA <i>SALICORNIA BIGELOVII</i> (TORR.) BAJO CONDICIONES DE SALINIDAD.....	23
5.2.1. Metas	23
5.2.2. Localización del sitio experimental.....	23
5.2.3. Material vegetal	23
5.2.4. Germinación de semillas de <i>S. bigelovii</i>	24
5.2.5. Tratamientos químicos y de biofertilización en semillas de <i>S. bigelovii</i>	26

5.3. EFECTO DE LA BACTERIA <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO INICIAL DE <i>SALICORNIA BIGELOVII</i> (TORR.)	30
5.3.1. Metas	30
5.4. EVALUACIÓN DE <i>SALICORNIA BIGELOVII</i> CON LA INOCULACIÓN DE <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> BAJO CONDICIONES DE CAMPO	35
5.4.1. Metas	35
5.4.2. Establecimiento del cultivo de <i>S. bigelovii</i>	35
5.4.3. Inoculación de la semilla de <i>S. bigelovii</i> (<i>SOS-10</i> y silvestre) con las bacterias <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Azospirillum halopraeferens</i>	36
5.4.4. Establecimiento de plántulas en el campo agrícola.....	37
5.4.5. Inoculación de <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Azospirillum halopraeferens</i> , vía sólida en esferas de alginato, en dos diferentes etapas vegetativas (Plántula, y floración).....	38
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
6.1. DETECCIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO EN LA RIZÓSFERA DE <i>SALICORNIA BIGELOVII</i> (TORR.)	45
6.1.1. Aislamiento de bacterias de la rizósfera.....	45
6.1.2. Perfil de la población bacteriana no cultivable asociada a rizósfera de <i>Salicornia bigelovii</i> mediante el análisis del polimorfismo en la conformación de cadena simple de DNA (single strand conformation polymorphism: SSCP)	53
6.2. INFLUENCIA DE LA BACTERIA <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> EN LA GERMINACIÓN DE <i>S. BIGELOVII</i> SILVESTRE Y <i>CV. SOS-10</i>	56
6.2.1. Porcentaje de germinación en genotipo mejorado <i>SOS-10</i>	56
6.2.2. Porcentaje de germinación en genotipo silvestre.....	56
6.2.3. Efecto en el crecimiento radicular en ambos genotipos.....	57
6.2.4. Efecto en la altura de las plántulas en ambos genotipos.....	60
6.2.5. Efecto en el peso fresco de ambos genotipos	60
6.2.6. Peso seco en plántulas de genotipo mejorado <i>SOS-10</i> y silvestre	60
6.2.7. Efecto de la salinidad sobre la adhesión de <i>K. pneumoniae</i> y <i>A. halopraeferens</i> al sistema radicular de genotipo mejorado <i>SOS-10</i> y silvestre.....	61
6.3. EFECTO DE LA BACTERIA <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> EN EL DESARROLLO INICIAL DE <i>SALICORNIA BIGELOVII</i>	64
6.4. EVALUACIÓN DE LAS VARIABLES DE CRECIMIENTO, DESARROLLO Y DE LA PRODUCCIÓN DE <i>SALICORNIA BIGELOVII</i> CON LA INOCULACIÓN DE <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> BAJO CONDICIONES DE CAMPO	66
6.4.1. Germinación	66
6.4.2. Etapa de desarrollo vegetativo.....	69
6.4.3. Floración, peso fresco, peso seco, longitud radicular y contenido de nitratos (NO_3) en la etapa fisiológica de floración	69
6.4.4. Proporciones de lípidos, proteínas y cenizas de tres partes vegetativas (raíz, tallo, parte aérea) en floración	77
6.4.5. Efecto de <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Azospirillum halopraeferens</i> en el rendimiento de <i>Salicornia bigelovii</i> (<i>SOS-10</i> y silvestre).....	79
6.4.6. Proporciones de lípidos, proteínas y cenizas en semilla	81
7. DISCUSIÓN GENERAL	85
8. CONCLUSIONES GENERALES	93
9. PERSPECTIVAS	95
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	97

PREFACIO

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., como requisito para obtener el grado de Doctor en Ciencias en el Uso y Manejo y preservación de los Recursos Naturales con Orientación en Ecología.

La presente tesis está basada en las siguientes dos publicaciones principales propuestas y comprometidas en el Programa de Trabajo Individual del sustentante:

E. Rueda-Puente, T. Castellanos, E. Troyo-Diéguez, J. L. Díaz de León-Alvarez, and B. Murillo-Amador. **Effects of a nitrogen-fixing indigenous bacterium (*Klebsiella pneumoniae*) on the growth and development of the halophyte *Salicornia bigelovii* as a new crop for saline environments.** *Journal of Agronomy and Crop Science*. Volume 189 Issue 5 Pag. 323 - October 2003.

Edgar O. Rueda-Puente, Thelma Castellanos C., Enrique Troyo-Diéguez, and Jose Luis Díaz de León-Alvarez. **Effect of *Klebsiella pneumoniae* and *Azospirillum halopraeferens* on the growth and development of two *Salicornia bigelovii* genotypes.** *Australian Journal of Experimental Agriculture*. Vol. 43 Issue 9. **In press (en prensa).**

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 5.1.1.- Localización del área de muestreo de plantas de <i>Salicornia bigelovii</i> en La Bahía de La Paz, B.C.S.....	16
Fig. 5.2.2.- Localización del área de muestreo de plantas de <i>Salicornia bigelovii</i> en El Comitán, Bahía de La Paz, B.C.S.	25
Fig. 5.4.5.2. Sistema de riego por aspersión desarrollado para <i>Salicornia bigelovii</i> bajo condiciones de campo en CIBNOR. La Paz, B.C.S.....	40
Fig. 6.1.1.1.A. Cromatograma mostrando la actividad de reducción de acetileno de la bacteria asociada a <i>S. bigelovii</i> , comparándola con el control <i>Azospirillum halopraeferens</i>	49
Fig. 6.1.1.1.B. Fijación de nitrógeno (reducción de acetileno) de cultivos de la bacteria fijadora de nitrógeno (BACRA) comparada con el control <i>A. halopraeferens</i>	50
Fig. 6.1.1.1.C.- Cinética de crecimiento de la bacteria con alta actividad reductora de acetileno (BACRA), asociada a rizosfera de <i>Salicornia bigelovii</i> y <i>A. halopraeferens</i>	51
Fig. 6.1.1.2.a. Pruebas bioquímicas realizadas a la cepa fijadora de N ₂ (alta actividad de reducción de acetileno-BACRA), asociada a rizósfera <i>S. bigelovii</i> , de acuerdo a Mc Faddin (1991).....	52
Fig. 6.1.1.2.b.- Identificación 16S rRNA, de la bacteria fijadora de nitrógeno aislada de la rizósfera de <i>Salicornia bigelovii</i>	53
Fig. 6.1.2. SSCP de los fragmentos del DNA ribosomal 16s amplificado por PCR a partir de la microflora asociada a rizósfera de <i>Salicornia bigelovii</i>	54
Fig. 6.2.1. Efecto de <i>K. pneumoniae</i> , el control biológico (<i>Azospirillum halopraeferens</i>), y el control químico (fitorregulador AG ₃), bajo tres concentraciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 M) en la germinación de dos genotipos: de <i>S. bigelovii</i> (A) ‘SOS-10’ y (B) ‘silvestre’. Las barras representan el error estandar de las media.....	58
Fig. 6.2.7. Unidades formadoras de colonias (UFC/mL) de <i>K. pneumoniae</i> y <i>A. halopraeferens</i> bajo tres concentraciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 M) adheridas al sistema radicular de dos genotipos de <i>S. bigelovii</i> ((A) SOS-10 y (B) Silvestre). Las barras representan el error estandar de las medias.....	62
Fig. 6.4.1. Influencia de <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Azospirillum halopraeferens</i> en la tasa de geminación (numero de semillas por día) de dos genotipos de <i>Salicornia bigelovii</i> (SOS-10 y silvestre) bajo condiciones de campo.	68
Fig. 6.4.2. Dinámica de crecimiento de dos genotipos de <i>Salicornia bigelovii</i> (SOS-10 y silvestre) por la influencia de <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Azospirillum halopraeferens</i> bajo condiciones de campo.....	70

- Fig. 6.4.3.A. Porcentaje final de floración en dos genotipos de *Salicornia bigelovii* (SOS-10 y Silvestre) por el efecto de bacterias fijadoras de N₂ (*Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens*) bajo condiciones de campo.....71
- Fig. 6.4.3.B. Efecto de bacterias fijadoras de N₂ (*Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens*) bajo condiciones de campo, en el peso seco y fresco de plantas en etapa de floración en dos genotipos de *Salicornia bigelovii* (SOS-10 y Silvestre). Las letras indican diferencias significativas (<0.05).....73
- Fig. 6.4.3.C. Efecto de bacterias fijadoras de N₂ (*Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens*) en la longitud radicular de dos genotipos de *Salicornia bigelovii* en la etapa de floración y bajo condiciones de campo75
- Fig. 6.4.3.D. Efecto de bacterias fijadoras de N₂ (*Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens*) en el contenido de NO₃/mL en savia de dos genotipos de *Salicornia bigelovii* en la etapa de floración y bajo condiciones de campo.....76
- Fig. 6.4.5. Efecto de bacterias fijadoras de N₂ (*Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens*) en la producción de biomasa (materia seca g m⁻²) obtenida de dos genotipos de *Salicornia bigelovii* (SOS-10 y Silvestre) bajo condiciones de campo..... 80
- Fig. 6.4.6. Esquema del efecto de las bacterias fijadoras de N₂ (*Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens*) en las principales etapas fenológicas de *Salicornia bigelovii* bajo condiciones de campo.....84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 5.2.5. Aplicación de tratamientos experimentales.....	27
Tabla 5.3.1.2 Tratamientos experimentales aplicados.....	32
Tabla 5.4.3. Tratamientos experimentales correspondientes a dos genotipos (SOS-10 y silvestre) inoculados con bacterias fijadoras de nitrógeno (<i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Azospirillum halopraeferens</i>) bajo condiciones de campo.....	37
Tabla 5.4.5.1 Programa de inoculación de esferas de alginato con bacterias fijadoras de nitrógeno (<i>K. pneumoniae</i> y <i>A. halopraeferens</i>) a dos genotipos de <i>S. bigelovii</i> (SOS-10 y silvestre) bajo condiciones de campo en la Paz, B.C.S. (CIBNOR).....	39
Tabla 5.4.5.2. Calidad del agua utilizada en la irrigación de <i>S. bigelovii</i> (SOS-10 y silvestre) inoculadas con bacterias fijadoras de nitrógeno (<i>A. halopraeferens</i> y <i>K. pneumoniae</i>) bajo condiciones de campo, en la Paz, B. C. S.....	40
Tabla 5.4.5.4. Condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa, horas sol y radiación fotosintéticamente activa) presentes en el estudio de dos genotipos de <i>S. bigelovii</i> (SOS-10 y silvestre) inoculadas con bacterias fijadoras de nitrógeno (<i>K. pneumoniae</i> y <i>A. halopraeferens</i>) bajo condiciones de campo, en la Paz, B.C.S.....	43
Tabla 6.1.1.A. Parámetros físicos y químicos de suelo asociado a rizósfera de <i>Salicornia bigelovii</i> muestreada en la Bahía de la Paz, B.C.S. para el aislamiento de bacterias fijadoras de N ₂	46
Tabla 6.1.1.B. Características morfológicas de los aislamientos bacterianos en rizósfera de <i>Salicornia bigelovii</i> de la Bahía de La Paz, B.C.S.....	47
Tabla 6.1.2. Resultados de caracterización (% similitud) de las bacterias asociadas a rizósfera de <i>Salicornia bigelovii</i> en la Bahía de La Paz, Baja California Sur, México.....	55
Tabla 6.2.3. Efecto de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , control biológico (<i>Azospirillum halopraeferens</i>) y el control químico (fitorregulador AG ₃), bajo tres concentraciones de NaCl. Los valores son los promedios de longitud de raíz, altura de plántula, peso fresco y peso seco en <i>Salicornia bigelovii</i> (genotipo ‘SOS-10’ y ‘genotipo silvestre’).	59
Tabla 6.3.A. Promedios de las variables longitud de plántula y longitud radicular, con respecto a las bacterias <i>K. pneumoniae</i> y <i>A. halopraeferens</i> (control biológico) y los dos tipos de inoculación (líquida y esferas) un mes después de la inoculación.....	65
Tabla 6.3.B. Unidades formadoras de colonias (UFC/mL) adheridas al sistema radicular de <i>S. bigelovii</i> SOS-10.....	65
Tabla 6.4.4. Efecto de bacterias fijadoras de N ₂ (<i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Azospirillum halopraeferens</i>), en el contenido de lípidos, proteínas y cenizas de tres partes vegetativas (raíz,	

tallos y parte aérea) en etapa de floración de dos genotipos de <i>Salicornia bigelovii</i> (SOS-10 y Silvestre) bajo condiciones de campo.	78
Tabla 6.4.5. Efecto de bacterias fijadoras de N ₂ (<i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Azospirillum halopraeferens</i>) sobre las variables producción de semilla (g planta ⁻¹ , g m ⁻² y kg ha ⁻¹) de dos genotipos de <i>Salicornia bigelovii</i> (SOS-10 y Silvestre) bajo condiciones de campo.....	79
Tabla 6.4.6.A. Efecto de bacterias fijadoras de N ₂ (<i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Azospirillum halopraeferens</i>) en el contenido de lípidos, proteínas, humedad y cenizas presente en semilla de dos genotipos de <i>Salicornia bigelovii</i> (SOS-10 y Silvestre) bajo condiciones de campo.....	82
Tabla 6.4.6.B. Efecto de bacterias fijadoras de N ₂ (<i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Azospirillum halopraeferens</i>) en el porcentaje (% absoluto) de ácidos grasos (palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico) en semilla producida en dos genotipos de <i>Salicornia bigelovii</i> (SOS-10 y Silvestre) bajo condiciones de campo.....	82
Tabla 6.4.6.C. Efecto de bacterias fijadoras de N ₂ (<i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Azospirillum halopraeferens</i>) en el periodo de vida (días) de dos genotipos de <i>Salicornia bigelovii</i> (SOS-10 y Silvestre) bajo condiciones de campo.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>A. halopraeferens</i>	<i>Azospirillum halopraeferens</i>
<i>S. bigelovii</i>	<i>Salicornia bigelovii</i>
N	Nitrógeno
AIA	Acido indol acético
UFC	Unidades formadoras de colonias
OAB	Medio de cultivo libre de nitrógeno Okon-Albrecht-Barris
Rennie	Medio de cultivo libre de nitrógeno Rennie
SSCP	Análisis del polimorfismo en la conformación de cadena simple de DNA (single strand conformation polymorphism: SSCP)
BPCP	Bacterias promotoras de crecimiento en plantas

1. ANTECEDENTES

Dentro de las zonas con alto potencial agrícola, las zonas áridas conforman alrededor del 43 % del área total del mundo. Entre los principales países que presentan este tipo de áreas en gran escala se encuentra Arabia Saudita, Norte de África, Brasil y México (San Pietro, 1982 a). En la República Mexicana, un área significativa es la península de Baja California, que engloba a los Estados de Baja California y Baja California Sur. En éste último las escasas precipitaciones, el agotamiento de las fuentes de recursos hidrológicos y la alta salinidad de los suelos representan una limitante para el desarrollo de la agricultura convencional (Ortega y Castellanos, 1995; SAGAR, 1999). Por lo anterior, es imprescindible orientar los esfuerzos de investigación para generar tecnologías agrícolas que innoven cultivos agroindustriales o bien desarrollar recursos vegetales endémicos que posean alto potencial de industrialización, y que gracias a su capacidad de producción en suelos salinos o condiciones de sequía, nos permitan optimizar la productividad del campo sudcaliforniano (SARH, 1981).

En las últimas dos décadas se han orientado los esfuerzos de investigación hacia el estudio y desarrollo de recursos vegetales que constituyan una alternativa a los tradicionales agroindustriales. Estos estudios muestran que las halófitas son los recursos biológicos más promisorios para explotar o desarrollar económicamente en las zonas áridas y costeras, ya que toleran altas concentraciones de sales y se desarrollan en terrenos costeros y suelos ensalitrados del mundo (O'Leary *et al.* 1985; Mass y Grieve, 1990; Glenn *et al.* 1995; Glenn *et al.* 1998),. Entre ellas destaca el género *Salicornia*, el cual está constituido por las especies: *S. pacifica*; *S. Subterminalis*; *S. virginica*; *S. borealis*; *S. maritima*; *S. rubra* y *S. bigelovii* (USDA, 2003); de las cuales las tres primeras son perennes y las demás anuales. De estas, *Salicornia bigelovii* es de gran interés, ya que se le ha encontrado un promisorio potencial agroindustrial y económico (Mota, 1990). La importancia agroindustrial de la misma, reside en su capacidad de producción

de forrajes, aceites vegetales y alimentos para consumo humano esencialmente ensaladas y harinas. Sumado a ello, ha quedado demostrada su aplicabilidad en industrias como la cosmetología, la construcción, (fibra seca prensada) y fundamentalmente para la recuperación de áreas degradadas por salinización, ya sea natural o inducida por prácticas agrícolas inadecuadas, lo cual favorece la economía rural (Glenn *et al.*, 1995). En Baja California Sur, *S. bigelovii* tiene una amplia distribución a lo largo de sus costas (Gleen *et al.*, 1994), por lo que es factible su desarrollo como nuevo cultivo en el noroeste de México con perspectivas de explotación comercial (Carlson, 2000). Según estudios previos concernientes a la producción de halófitas, la productividad de este tipo de plantas está limitada por la disponibilidad de nitrógeno, lo que tiene un evidente efecto en su crecimiento, reproducción y niveles de nitrógeno en biomasa, entre otros aspectos. Una solución para eliminar esta limitante sería la aplicación de fertilizantes sintéticos. Sin embargo, frecuentemente se cae en un inadecuado manejo y uso indiscriminado, lo cual afecta de una manera importante a la microflora del suelo, incluyendo los microorganismos benéficos (Martínez, 1996).

Dentro de los microorganismos considerados benéficos, se destacan los que se consideran promotores del crecimiento. Estos se caracterizan por estar presentes en la rizósfera y por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y fitohormonas (Jena *et al.*, 1992; Gamo y Sang, 1990). Estas características son de alta repercusión en la productividad agrícola ya que potencialmente pueden reducir los costos de producción al disminuir o eliminar el uso de fertilizantes químicos (Okon y Labandera, 1994). Entre los microorganismos fijadores de nitrógeno y/o productores de fitohormonas más estudiados se encuentran bacterias de los géneros *Rhizobium spp.*, *Azotobacter spp.*, *Klebsiella spp.* y *Azospirillum spp.* (Buckman y Brady, 1977; De Troch y Vanderleydan, 1996). El género *Rhizobium spp.* se asocia a las plantas leguminosas. Por su parte, el género *Azotobacter spp.* y *Klebsiella spp.* son cultivo-

inespecíficas y el género *Azospirillum* spp tiene especificidad para pastos, pero también se ha reportado una alta capacidad para asociarse con hortalizas como tomate y chile y con cactáceas (Bashan *et al.*, 1989; Castellanos, 1998). Uno de los modelos de estudio de interacción planta-microorganismo el de planta-*Azospirillum*, ya que de los efectos más sobresalientes, son el promover en las diferentes especies de plantas (gramíneas principalmente), bajo condiciones de suelo y climas diferentes, un incremento en el peso total, en la cantidad de nitrógeno en granos y brotes, número de tallos, altura de planta, tasa de germinación, floración y aparición temprana de la espiga (Okon y Labandera, 1994). *Azospirillum* está conformado por las especies *A. brasilense*, *A. lipoferum* (Tarrand *et al.*, 1978), *A. amazonense* (Magalhaes *et al.*, 1983), *A. irakense* (Khammas *et al.*, 1989) y *A. halopraeferens* (Reinhold *et al.*, 1987). No obstante lo anterior, es necesario ampliar la gama de recursos microbianos procedentes de plantas endémicas, explorando las poblaciones microbianas en la rizósfera de plantas halófitas facultativas como *Salicornia bigelovii*, determinar su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, y estudiar los efectos de la aplicación de estos microorganismos y su relación con la demanda de nitrógeno por parte de este tipo de plantas.

2. INTRODUCCIÓN

La escasez de agua de lluvia así como la del subsuelo para irrigación, la salinización de suelos agrícolas derivada de una inadecuada aplicación del agua de riego y una excesiva aplicación de fertilizantes, son algunos de los principales problemas que está enfrentando la agricultura a nivel mundial (Shannon, 1997). Lo anterior ha originado la necesidad de generar nuevos cultivos que presenten la capacidad de desarrollarse y producir en suelos ensalitrados y hábitat costeros, donde el agua de mar constituye el principal recurso hídrico (San Pietro, 1982 b; Jensen, 1985).

Las halófitas son plantas que se desarrollan en hábitat salinos, donde debido a sus propiedades fisiológicas pueden absorber y mantener grandes cantidades de sales a una concentración de 0.01 S/ cm = una parte por mil (1 ppt) mediante el proceso de regulación osmótica y el almacenamiento de sales en sus tejidos (Greenway y Munns, 1980). Otra vía de tolerancia a las sales de las halófitas es mediante el control, al nivel radicular, del paso de iones de sodio, mientras que en las glicófitas la toxicidad de los iones, cuando están presentes en la solución de suelo, no puede ser mitigada debido a que el sodio en especial antagoniza al potasio e inhibe numerosos procesos fisiológicos (Mass *et al.*, 1990). En algunas halófitas, existen procesos fisiológicos como el de filtración a nivel radicular, o exclusión de iones sodio, o bien excreción a nivel foliar por medio de sistemas especializados (glándulas de excreción) y adicionalmente, el secuestro de iones tóxicos a nivel vacuolar (Mass *et al.*, 1990; Gleen *et al.*, 1994).

Jones (1998) menciona que las halófitas están conformadas por una amplia gama de especies (alrededor de 3000), que van desde zacates, arbustos y matorrales, hasta el sistema ecológico de los mangles. Sin embargo, entre los géneros más destacados, por su función de colonización, se encuentran las especies de *Salicornia*. (Riley *et al.*, 1992).

2.1. *Salicornia* spp.

Los estudios correspondientes a esta planta indican que es una halófito que pertenece a la familia Chenopodiaceae y que en estado adulto es altamente tolerante a la salinidad (Terrence y Ungar, 1982; Jeyarany y Ungar, 1984; Wolf y Jefferiers, 1986). El género de *Salicornia*, está constituido por las especies *S. pacifica*; *S. Subterminalis*; *S.virginica*; *S. borealis*; *S. maritima*; *S. rubra* y *S. bigelovi* (Riley *et al.*, 1992).

2.1.1. *Salicornia bigelovii*

Estudios relacionados con su distribución indican que *S. bigelovii* comúnmente se desarrolla en las costas y hábitat salinos, marismas de Europa, África y Norte de América (Ungar, 1987 b). Asimismo, indican que se le encuentra más allá de la marisma principal (zona intermareal inferior) de Europa, mientras que en América del Norte se encuentra distribuida en la zona superior de intermareas (Glenn *et al.*, 1994). A nivel mundial se han detectado seis áreas donde las halófitas se desarrollan, las cuales se encuentran en India, Irak, Península de Arabia, Noreste de África, Australia, América Latina (Chile y Perú), costas del Océano Pacífico de Estados Unidos y en la península de Baja California de la República Mexicana (Ungar, 1987 a). En México, es común que se desarrolle a lo largo de las costas del Golfo de México, en hábitat sujetos a inundaciones periódicas debidas al ciclo de mareas (CICESE, 2002). *S. bigelovii* es una halófito anual cuyo ciclo de vida oscila de 10 a 12 meses. Está clasificada como una halófito facultativa, es decir puede llevar a cabo su ciclo de vida a diversas concentraciones de salinidad (Philipupiya y Ungar, 1984; Glenn y O'Leary, 1984. Ungar, (1981) reporta que en condiciones de laboratorio el porcentaje de germinación de *Salicornia bigelovii* disminuye considerablemente a medida que aumenta la salinidad y que una concentración igual o mayor a 0.05 S/ cm de cloruro de sodio inhibe la germinación.

También se ha reportado que la temperatura en interacción con la salinidad influye en el índice o porcentaje de germinación, como una germinación óptima cuando se emplean temperaturas bajas y concentraciones moderadas de salinidad inducidas por NaCl, o bien temperaturas altas y concentración baja de salinidad (Rivers y Weber, 1971). Una planta desarrollada presenta ramas suculentas que brotan del tallo principal, carentes de hojas, articuladas y erectas, donde se generan entre cada entrenudo seis flores con sépalos verdes y suculentos, en dos grupos de tres flores, que producen un promedio de 2 a 3 semillas cada una (Mc Cabe, 1995; Glenn *et al.*, 1991; Glenn *et al.*, 1994; Glenn *et al.*, 1998). El período de inicio de floración con respecto a las áreas costeras de Baja California Sur ocurre desde inicios de marzo hasta mayo, llegando a su madurez en los meses de octubre a diciembre (Glenn *et al.*, 1994).

2.1.2. Usos Potenciales

Los estudios efectuados sobre *S. bigelovii* indican que presenta potencial agroindustrial, ecológico y social de alto impacto. Entre sus posibles usos figuran la producción de forrajes, aceites vegetales y alimentos para consumo humano, como base de ensaladas y harinas, así como en la industria cosmetológica y la construcción de material para construcción de casas-habitación a base de mezclas de fibra con adobe (Glenn *et al.*, 1994). Otros usos incluyen la recuperación de suelos degradados así como la recuperación de áreas abandonadas por la agricultura tradicional, principalmente en zonas costeras (Mota, 1990). Un importante derivado agroindustrial de *Salicornia* es la obtención de ácidos grasos con alto porcentaje del ácido insaturado linoleico (74%) (Glenn *et al.*, 1991). Actualmente, en Bahía de Kino, Sonora, se lleva a cabo el cultivo comercial de *Salicornia bigelovii* para exportación a diversos países de Europa, como Francia, España, Holanda e Inglaterra, para uso alimenticio y la extracción y producción de aceites. El escalamiento de su producción depende de por tanto de la

intensificación de nuestro conocimiento sobre diversos aspectos de su biología, fisiología, bioquímica e interacción con microorganismos benéficos que contribuyan a un mejor desarrollo y mejorada productividad de este recurso, sin alterar el medio ambiente

2.1.3. Manejo en cultivo: nivel experimental

Mota (1990; 1999) menciona que en lo referente al manejo del cultivo, se han realizado un número de experimentos tendientes a mejorar el sistema tecnológico para la producción comercial de *S. bigelovii*. El cultivo se inicia con una preparación del suelo, posteriormente la siembra se efectúa a razón de 30 a 40 kilos de semilla por hectárea (utilizando líneas avanzadas de SOS-7 o SOS-10); inmediatamente después de la siembra se inicia el riego con un sistema de riego presurizado utilizando agua potable. Posterior a la germinación, se incrementa paulatinamente la salinidad en el agua de riego. Estudios relacionados con su producción utilizando agua de mar han permitido dar a conocer que con una salinidad del agua de mar hasta de 1.17 S/ cm se obtienen las máximas producciones de biomasa y que por arriba de este valor hasta 1.67 S/ cm la producción es nula. La práctica cultural de fertilización nitrogenada establecida consiste en iniciar este programa a los 30 días de la siembra y terminarlo 45 días antes de la cosecha. Este programa de fertilización se aplicó en Guerrero Negro, B.C.S. (México) en forma de aspersión utilizando un sistema de pivote central, totalizando una aplicación de 250 a 500 kg ha⁻¹ de nitrógeno (NH₃, UREA) por ciclo, donde la dosis nutrimental óptima de N por planta es de 30-50 gL⁻¹. Concentraciones por arriba de dicho valor son inapropiadas para incrementar los rendimientos (Gleen *et al.*, 1994). Por otro lado, en estudios relacionados con microelementos (zinc, cobre, manganeso) utilizando agua de mar en la irrigación de esta planta, se ha encontrado que dichos micronutrientes presentes en el agua de mar son los requeridos para obtener un crecimiento adecuado de esta especie halófila. Las

mejores fechas de siembra recomendadas en la península de Baja California para la producción de semilla son en los meses de enero a marzo y para verdura de septiembre a mayo, cuando se puede obtener una producción de biomasa (materia seca) hasta de 22,000 kg·ha⁻¹ y de semilla de 1500 a 2000 kg·ha⁻¹, con una potencialidad de extraer 600 kg de aceite por ha⁻¹ (Gleen *et al.*, 1994; Mota, 1999). El contenido proteico de la planta varía desde un 35-45% de la materia seca. El contenido de cenizas es de un 30-45% del peso total de la materia seca. Sus semillas representan aproximadamente del 10 al 15% de su peso total, las cuales contienen alrededor de 30% del total de proteínas; de fibra un 5-7%; cenizas 5-7 y aceites desde un 26-33%, figurando el ácido linoleico de un 73-75%, oleico de un 12-13.3%, palmítico con un 7.7-8.7%; linolénico con un 2.4-2.7% y esteárico 1.6-2.4%. Por lo anterior, esta especie se distingue para el futuro inmediato como un importante soporte en la economía agrícola con un posible impacto positivo en el desarrollo regional del Estado de Baja California Sur o de la península de Baja California principalmente en las zonas costeras.

2.2. Bacterias promotoras de crecimiento

De acuerdo a la cantidad de fertilizante nitrogenado necesario para la producción de *Salicornia bigelovii*, así como el problema de introducir y desbalancear el equilibrio químico en sistemas costeros o áreas agrícolas ya afectadas por salinidad, es importante encontrar un sistema alternativo que permita reducir costos de producción y al mismo tiempo evite una erosión del capital suelo.

Los microorganismos con efecto benéfico en las plantas pueden tener un potencial considerable como agentes biocontroladores y biofertilizantes. Se distinguen tres grandes grupos: a) microorganismos fijadores de nitrógeno, b) hongos micorrízicos, c) bacterias promotoras de crecimiento. Este último grupo de bacterias es conocido como PGPB-Plant

Growth-Promoting Bacteria (siglas en inglés) = BPCP (Bacterias promotoras de crecimiento de plantas) fue definido por Kloepper *et al* (1992) como bacterias habitantes de la raíz que estimulan significativamente el crecimiento de plantas. Sin embargo, Jiménez *et al.*, (2001) han indicado que en años recientes se ha despertado cierta controversia, ya que no se sabe hasta qué punto se puede considerar a una rizobacteria como una bacteria promotora de crecimiento, por lo que se han establecido cuatro características que definen este grupo:

- Que no requieran de la invasión interna de tejidos en plantas, como ocurre en hongos micorrízicos con la formación de nódulos o arbusculos en el caso de *Rhizobium*.
- Que tengan una elevada densidad poblacional en la rizósfera después de su inoculación, ya que una población que declina rápidamente tiene una baja capacidad competitiva con la microflora nativa del suelo.
- Que presenten capacidad de colonización efectiva en la superficie de la raíz y como consecuencia puedan influir positivamente en el crecimiento de la planta.
- Que no produzcan daño en el hombre ni a otros microorganismos.

En cuanto al efecto positivo sobre el crecimiento por las plantas, las BPCP pueden actuar de manera directa o indirecta:

Mecanismos indirectos: los metabolitos producidos de las BPCP pueden funcionar como determinantes antagónicos, involucran aspectos de control biológico, suprimen o inhiben el crecimiento de microorganismos perjudiciales para el desarrollo de la planta, vía de producción de sideróforos, antibióticos, acción de enzimas líticas (gluconasa, quitinasas) o inducción de mecanismos de resistencia.

Mecanismos directos: ocurren cuando los metabolitos producidos por algunas cepas de las bacterias son utilizados como reguladores de crecimiento o precursores de estos por parte de la planta.

La conjunción de ambos mecanismos de acción ha dado como resultado la promoción evidente del crecimiento de plantas; se ha observado un incremento en la emergencia, el vigor y el peso de plántulas, un mayor desarrollo en sistemas radiculares y un incremento hasta de 30% en la producción de algunos cultivos de interés comercial.

2.3. *Azospirillum* spp

Azospirillum spp fue aislada por primera vez por Beijerinck en 1959 en Dinamarca, a partir de suelos arenosos pobres en N; inicialmente fue denominada con el nombre de *Spirillum lipoferum* (Beinjerinck, 1925). Dobereineiner y Day, (1976) fueron los primeros autores en reportar su amplia distribución en la rizósfera de varios pastos tropicales, silvestres y cultivados, cereales y leguminosas, en suelos tropicales, subtropicales y templados de todo el mundo. Estos microorganismos pueden encontrarse en la filósfera o en la rizósfera. (Fallik *et al.*, 1988; De Troch y Vanderleyden, 1996); se caracterizan por adherirse a la superficie de raíz (Castellanos, 1998) y no formar nódulos.

Las bacterias del género *Azospirillum* poseen la capacidad de fijar N₂ atmosférico, lo cual proporciona a las plantas nitrógeno asimilable y de promover la liberación de hormonas, como ácido indolacético (AIA) y auxinas, lo que da como resultado una estimulación para la ramificación de las raíces y desarrollo de pelos radiculares (33-40%), adicionales. Además, se ha sugerido que están involucradas en una mejor absorción de minerales y agua por parte de la planta lo que contribuye al crecimiento y aumento del rendimiento de las plantas (Kapulnik *et al.*, 1981; Khammas *et al.*, 1989; Bashan y Holguin, 1997 b). Dentro de los diferentes géneros

se destaca *Azospirillum halopraeferens* cuya característica importante es su adaptación a suelos o ambientes con altos contenidos de sales, gracias a que posee un mecanismo osmótico para regular la acumulación de solutos orgánicos; esta propiedad de este tipo de microorganismos es importante, ya que los suelos agrícolas de zonas áridas son afectados por problemas de salinidad.

Los resultados experimentales y prácticos en el uso de las especies de *Azospirillum* han concluido que estas especies son capaces de promover la producción agrícola en diferentes suelos y condiciones de clima. El efecto de *Azospirillum* sobre las plantas parece ocurrir al inicio del desarrollo y la intensidad de dicho efecto depende de las condiciones del medio ambiente, del suelo, de la especie de vegetal, de las formas de cultivo y de la concentración óptima del inóculo (1×10^5 a 1×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC/semilla o planta) (Bashan *et al.*, 1989). Los resultados han sido significativos en varios parámetros de crecimiento, los cuales en numerosos casos aumentan el rendimiento del cultivo desde un 5% hasta un 30%, cuando reemplazan fertilizantes con alto porcentaje de nitrógeno (Okon y Labandera, 1994). En la Universidad Autónoma de Puebla se inocularon grandes extensiones de suelos agrícolas cultivados con maíz y trigo con diferentes cepas de *Azospirillum* obteniéndose incrementos significativos en el rendimiento de la cosecha de ambos granos. Los estudios demostraron que la inoculación en la gramíneas *Triticum aestivum* L. con una cepa de *Azospirillum brasilense*, aislada de la rizósfera de *Brachiaria mutica*, mostró mejores resultados que la inoculación con cepas de colecciones aisladas de otras partes del mundo (Okon y Labandera, 1994). Otro estudio demostró que la respuesta de inoculaciones de *Azospirillum* spp es influenciada por fertilizantes a base de N, P y K, ya que estos incrementan la población de esta bacteria, lo cual repercute en una mayor producción de biomasa en las plantas (Kapulnik *et al.*, 1981; Negi *et al.*, 1991; Nahidh y Hakeem, 1991).

Es por lo anterior, que el presente estudio tiene el propósito de aislar y seleccionar nuevas cepas que representen una fuente exitosa de inoculantes biológicos para la halófito *Salicornia* y disminuir considerablemente el uso de la fertilización nitrogenada, utilizando microorganismos endógenos asociados a la halófito *Salicornia bigelovii*.

3. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la población microbiana en la rizósfera de la halófito *Salicornia bigelovii* para detectar, aislar e identificar bacterias endógenas con capacidad de fijar N₂ atmosférico, evaluar la respuesta de la planta en presencia de estas bacterias, con el fin de determinar su potencial para sustituir o disminuir el uso de fertilizantes químicos y por tanto favorecer una alta productividad en el cultivo de este recurso con alto potencial agroindustrial.

3.1. Objetivos particulares

1.- Detección, aislamiento, purificación de bacterias capaces de fijar N₂ atmosférico asociadas a la rizósfera natural de *Salicornia bigelovii*.

- a) Determinar la capacidad de fijación de nitrógeno de los aislados bacterianos.
- b) Ampliar el conocimiento de la diversidad microbiana presente en rizosfera de *Salicornia bigelovii*, por métodos moleculares: análisis del polimorfismo en la conformación de cadena simple de DNA (single strand conformation polymorphism: SSCP)
- c) Conformar un cepario de bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas endémicamente a *S. bigelovii*.
- d) Evaluar a *Salicornia bigelovii* bajo la interacción con aislados bacterianos endémicos de su rizósfera con capacidad fijadora de nitrógeno atmosférico en condiciones de salinidad.

Las variables a evaluar en semilla y planta son:

- a) El porcentaje de germinación, tiempo y tasa de floración, altura de plantas, longitud radicular, y madurez fisiológica evaluando la producción de biomasa seca, de semilla por planta y microcuena.
- b) Determinar cuantitativa y cualitativamente los tipos y proporciones de ácidos grasos de la semilla.

4. HIPÓTESIS

1.- La rizósfera de *Salicornia bigelovii* contiene poblaciones bacterianas que tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico.

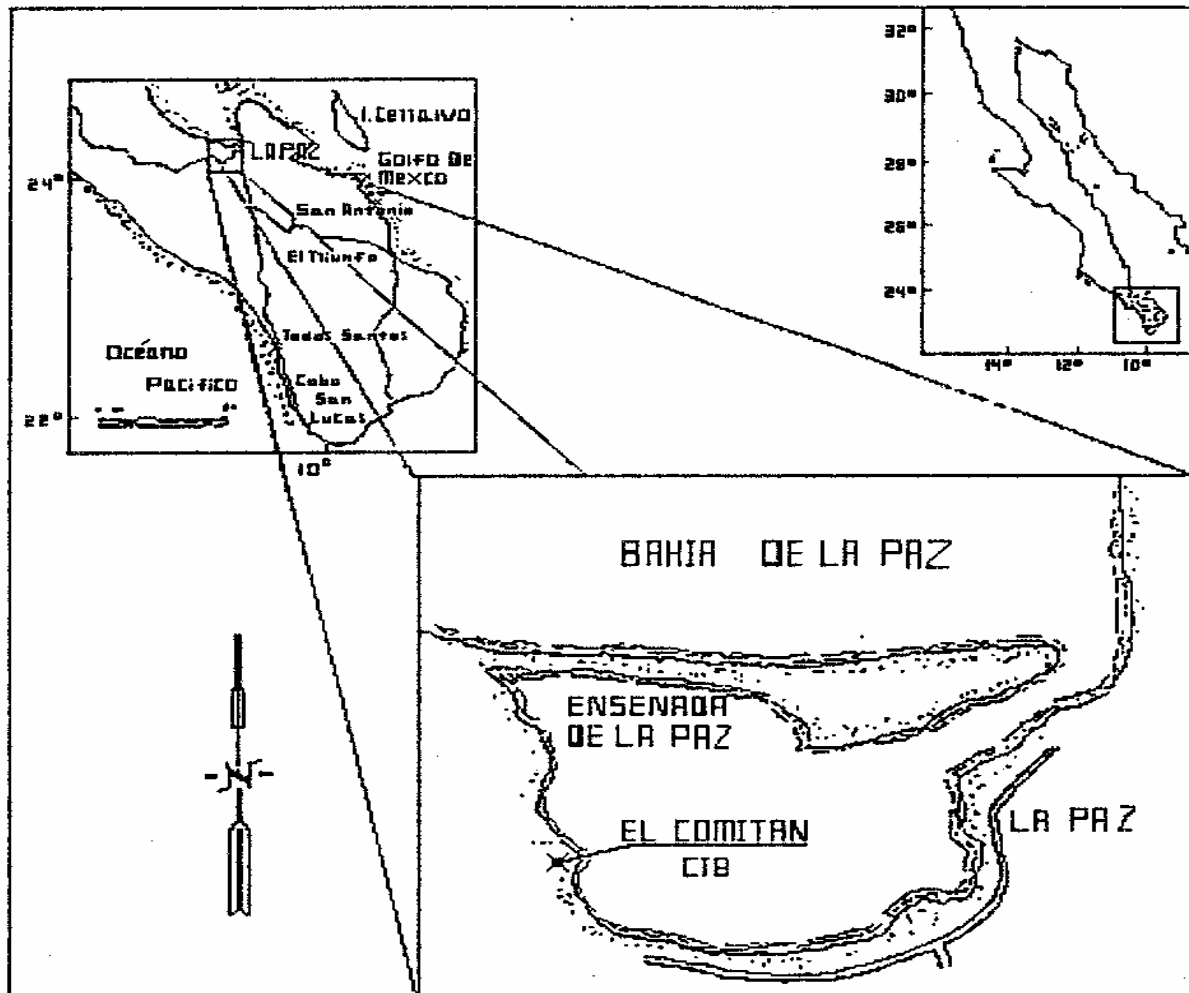
2.- La asociación con bacterias fijadoras de nitrógeno endémicas tienen como efecto modificar cuantitativamente, de manera favorable, las diferentes variables de crecimiento de *Salicornia bigelovii*.

5. SECUENCIA EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA

5.1. AISLAMIENTO Y DETECCIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO EN LA RIZÓSFERA DE *Salicornia bigelovii* (Torr.) EN LA BAHÍA DE LA PAZ, B.C.S., SU CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MEDIANTE TÉCNICAS DE CULTIVO Y análisis del polimorfismo en la conformación de cadena simple de DNA (single strand conformation polymorphism: SSCP)

5.1.1. Área de muestreo y colecta de *S. bigelovii*

El muestreo de plantas de *Salicornia bigelovii* se realizó en la bahía de La Paz, área que se localiza entre las coordenadas 24° 20'N, 110° 20'W y 24° 10'N y 110° 20' W, a 17 Km al oeste de la ciudad de La Paz (Fig. 5.1.1). Para la colecta de plantas se consideraron todas aquellas plantas en dos estados fenológicos (plántula y planta madura) siempre y cuando no estuvieran deshidratadas. Se obtuvieron plantas con sistema radicular y suelo adherido, considerando no realizar movimientos bruscos que hicieran desprender el suelo de la raíz. Las plantas obtenidas con suelo se depositaron en bolsas de plástico color negro y se etiquetaron con sus correspondientes datos de ubicación de colecta; durante el recorrido se guardaron en un recipiente térmico para mantenerlas a una temperatura entre 4 y 10° C. Una vez finalizado el muestreo, el material obtenido se trasladó al laboratorio de Microbiología del CIBNOR para la obtención de bacterias asociadas.



Puntos de muestreo: 1= CIBNOR; 2= Comitán; 3=CETMar, La Paz; 4= carretera al norte de la cd. de la Paz 5 km delante de la Paz rumbo a Pichilingue; 5= Estanque UABCS.

Fig. 5.1.1- Localización del área de muestreo de plantas de *Salicornia bigelovii* en La Bahía de La Paz, B.C.S.

5.1.2. Aislamiento de microorganismos asociados a la rizósfera de *S. bigelovii*

a).-Sistema radicular.

Se obtuvieron plantas maduras de *S. bigelovii*, se les removió el suelo adherido y después de lavar las raíces con agua potable se cortaron en segmentos de 1 a 2 cm, los cuales fueron depositados en dos medios de cultivo líquidos, libres de una fuente de nitrógeno; uno de ellos fue el medio denominado OAB= Okon-Albrecht-Barris (Reinhold *et al.*, 1987) y el otro fue el medio conocido como Medio Rennie (Rennie, 1981). Posteriormente los medios que contenían los segmentos de raíz se incubaron por un período de 36 a 48 h, a una temperatura de 30° C y con agitación constante de 150 revoluciones por minuto (rpm). Después de haber establecido los cultivos bacterianos se realizaron diluciones decimales hasta de 10⁻⁶ utilizando una solución salina al 0.85%. Se realizaron siembras (volumen de inóculo 0.1 mL) por dispersión con varilla microbiológica tanto en medios sólidos como líquidos de OAB y Rennie, conteniendo 0, 0.25, 0.50 y 0.75 mM de NaCl, y se incubaron a 30° C, por espacio de 4 días. Esta prueba se realizó por triplicado.

b).-Suelo adherido.

Se tomaron 4 g de suelo adherido a raíces y se diluyeron en agua destilada estéril en una proporción de 1:100; posteriormente, la solución resultante fue diluida en serie en una proporción 1:10 y de la quinta dilución se tomó 0.1 mL para sembrar en medios líquidos tanto OAB como Rennie conteniendo 0.0, 0.25, 0.50 y 0.75M de NaCl, sin fuente de nitrógeno. Los inóculos fueron incubados a 30°C con agitación constante de 150 rpm durante 5 a 7 días. El cultivo se efectuó por triplicado.

5.1.3. Selección y purificación de los microorganismos

Con la finalidad de confirmar la purificación de las cepas aisladas, las bacterias presentes en los cultivos fueron reaisladas, cultivándose en medios sólidos OAB y Renie a 30° C durante 24 h. Cabe indicar que en esta prueba se consideró una concentración de 0.5M de NaCl, en virtud de que en la misma se observó la mayor presencia de colonias bacterianas diferentes considerándose aspectos de morfología colonial y morfología celular, de acuerdo a Manovsky (1982).

5.1.4. Determinación de la capacidad de fijación de nitrógeno por las bacterias aisladas

Para identificar cepas fijadoras de N₂ se realizaron pruebas de reducción de acetileno. Esta prueba se fundamenta en la capacidad de la enzima nitrogenasa de reducir el acetileno a etileno el cual se cuantificó por cromatografía de gases. La actividad de la enzima mencionada demuestra la actividad de fijación de nitrógeno atmosférico por parte de las bacterias. En botellas de suero con medio de cultivo libre de N semilíquido (2 % de agar bacteriológico), se suspendió una concentración bacteriana conocida (1×10^9), se sellaron con tapones de plástico y se incubaron a 30 °C durante 5 días. Posteriormente, de cada botella se extrajo 1 mL de aire con una jeringa y se inyectó la misma cantidad de acetileno, para ser incubadas durante 48 h a la misma temperatura. La prueba se llevó a cabo por quintuplicado comparándose conjuntamente con una cepa de *Azospirillum halopraeferens* AU10 (ATCC). En el cromatógrafo se inyectaron 50 µL de acetileno y 50 µL de etileno y el tiempo de residencia de cada valor máximo (pico) se utilizó como estándar. El análisis de etileno se realizó mediante cromatografía de gases utilizando el cromatógrafo Varian 6000 (Varian Instrument Group,

Georgia, Atlanta, U.S.A), equipado con detector de ionización de flama de hidrógeno (FID). Las condiciones operativas constaron de una columna de acero inoxidable empacada con Porepak N, 80/100, 50 x 0.2 cm; la temperatura de la columna fue de 60°C, la temperatura del detector 200°C, la temperatura del inyector 50°C, la tasa de flujo del hidrógeno y nitrógeno fue 25 mL·min⁻¹ y la tasa de flujo de aire de 300 mL·min⁻¹ (Hardy *et al.*, 1968).

5.1.5. Colección de cepas endémicas de la rizósfera de *S. bigelovii*.

Los aislados bacterianos purificados fueron inoculados en medio de cultivo líquido libre de nitrógeno (Rennie) conteniendo glicerol al 15%, en tubos Eppendorf de 1.5 mL y almacenados a una temperatura de -70° C (Carrillo *et al.*, 1998).

5.1.6. Caracterización de bacterias

La caracterización de los microorganismos se desarrolló por medio de análisis por cromatografía de gases de ácidos grasos metil ésteres (FAME) según Sasser (1990), seguida de una secuenciación del DNA que codifica para el RNA ribosomal 16S (ACCULAB, Lake Drive* Newark, DE). También se emplearon pruebas bioquímicas (Producción de ácido de glucosa anaeróticamente, Prueba de Indol, Prueba rojo de metilo, Prueba de acidez a 48 h. aeróticamente, Citrato de Simmons, Reacción de Vogges-Praskauer, Producción de gas de lactosa , Prueba de coliforme fecales 44° C-, Prueba de motilidad), de acuerdo a Mc Faddin, (1991).

5.1.7. Perfil de la población bacteriana no cultivable asociada a rizósfera de *Salicornia bigelovii* mediante el análisis del polimorfismo en la conformación de cadena simple de DNA (single strand conformation polymorphism: SSCP)

5.1.7.1. Área de muestreo y colecta de *S. bigelovii*.

Plantas de *Salicornia bigelovii* que se desarrollan en forma natural en la Bahía de la Paz fueron obtenidas en una etapa reproductiva (floración) y para ello se tomaron las mismas consideraciones descritas anteriormente en la sección 5.1.2. sobre el muestreo de plantas.

5.1.7.2. Población bacteriana no cultivable asociada a la rizósfera de *Salicornia bigelovii* mediante SSCP

5.1.7.2.1. Extracción de DNA bacteriano.

Las raíces de cada una de las plantas colectadas, fueron lavadas cuidadosamente con solución salina al 0.85% de NaCl, para desprender el suelo adherido, considerando no dañar las raíces laterales de la raíz principal. Las raíces fueron seccionadas en fragmentos de 2, 3 y 4 cm, desprendiendo la cutícula de las raíces principales con la ayuda de un bisturí. Los cortes vegetativos fueron depositados en tubos que contenían 20 mL de NaCl al 0.85% y centrifugadas a 5000 g/ 30 m a 4°C, con la finalidad de separar las raíces del paquete celular microbiano. El paquete microbiano fue resuspendido en una solución amortiguadora (TES + SDS al 1%), se congeló durante 5 m a -196°C en nitrógeno líquido y se mantuvieron en agitación constante a 65°C durante 7 m. Este proceso de disrupción bacteriana por congelación-descongelación fue ejecutada 5 veces. Posteriormente a cada tubo se le añadió 100

μL de proteinasa K (16 mg mL^{-1}), incubándose a 65°C durante 7 m. De cada uno de los tubos se tomaron 8 mL y se depositaron en tubos Eppendorf de 20 mL, adicionándose a los mismos, 800 μL de fenol-cloroformo alcohol isoamílico (25:24:1). Las partículas sobrenadantes se removieron por centrifugación a 14000 rpm durante 10 m a 4°C . La fase superior (600 μL) se transfirió a tubos Eppendorf (1.6 mL), se les añadió 600 μL de cloroformo alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugaron a 8820 rpm durante 5 m a 4°C . La fase superior de los tubos (600 μL) fue transferida a otros tubos Eppendorf, para posteriormente añadirles 600 μL de isopropanol o metanol frío. Los tubos fueron mantenidos posteriormente a -20°C durante 24 h. Enseguida, fueron centrifugados a 12,000 rpm durante 7 m y finalmente los tubos se colocaron boca-abajo para que se evaporara todo el alcohol. Finalmente el DNA obtenido se homogenizó en 20 μL 10 microlitros de una solución amortiguadora TE buffer a un pH de 8.0 (Ausubel *et al.*, 2002).

5.1.7.2.2. Amplificación del DNA ribosomal 16s

por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y SSCP.

Una vez obtenido el DNA microbiano, la técnica de SSCP se desarrolló de acuerdo a Christoph *et al.*, (2001), la cual consistió primeramente en amplificar por medio de PCR específicamente una región del gen ribosomal 16s bacteriano utilizando iniciadores (primers) fosforilados y no fosforilados. Se realizó una digestión con la enzima exonucleasa (LAMBDA) con la finalidad de obtener cadenas sencillas. Posteriormente se desarrolló una electroforesis en un gel de acrilamida (PAGE) no desnaturizante al 7% (MGE 20x20). Las condiciones de electroforesis fueron a 20°C , con un voltaje de 400 mV en un tiempo de 14 a 16 h. Las bandas fueron reveladas con el método de tinción de plata. Brevemente, se fijaron las bandas de DNA con ácido acético, tiñéndose con nitrato de plata con formaldehído durante 30 m, para después

ser lavado con agua destilada durante 20 s para evitar alteraciones en el gel y ser revelado con bicarbonato de sodio/formaldehído y tiosulfato. DNA 16s de cadena sencilla de *Bacillus licheniformis*, *Rhizobium trifolii*, *Flavobacterium jashmoniae* y *Agrobacterium tumefaciens* fueron utilizados como referencia en el gel SSCP.

5.1.7.2.3. Aislamiento de cadenas sencillas, secuenciación y análisis de la secuenciación de DNA

Una vez revelado el gel, de este se recuperaron los productos (bandas de cadena sencilla de DNA) mediante un corte con bisturí. En esta fase, el grosor, lo angosto y constancia de las bandas son criterios para la elección de las bandas (bandas de ADN para ser secuenciadas). En este estudio se consideraron las bandas delgadas y tenues, ya que estas al parecer son las que nos pueden proveer información sobre nuevos microorganismos bacterianos y de cómo puede estar constituida una población bacteriana (Castellanos, 2002).

Las bandas aisladas (gel + cadena sencilla de ADN) fueron reamplificadas mediante PCR (Tebbe *et al.*, 2001), y se les determinó su secuencia nucleotídica. Con las secuencias obtenidas se realizó una comparación con secuencias depositadas en el Gen Bank mediante el programa BLAST.

5.2. EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE *Klebsiella pneumoniae* EN LA GERMINACIÓN DE LA HALOFITA COSTERA *Salicornia bigelovii* (Torr.) BAJO CONDICIONES DE SALINIDAD.

5.2.1. Metas

1.- Determinar el efecto de la bacteria *Klebsiella pneumoniae*, comparado con un control biológico (*Azospirillum halopraeferens*) y un fitorregulador sintético en la germinación de semilla mejorada y silvestre de *Salicornia bigelovii* bajo tres concentraciones de cloruro de sodio (NaCl). Las variables evaluadas fueron el porcentaje de germinación, tasa de germinación, longitud radicular, altura, peso fresco y peso seco.

2.-Cuantificar las unidades formadoras de colonias de *K. pneumoniae* así como del control biológico (*Azospirillum halopraeferens*), adheridas a raíces de dos genotipos de *S. bigelovii* (SOS-10 y Silvestre).

5.2.2. Localización del sitio experimental

Esta fase experimental se desarrolló en el laboratorio de germinación del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. localizado en El Comitán, B.C.S., ubicado en las coordenadas 24° 10' N y 110° W, a 17 Km al oeste de la ciudad de La Paz, B.C.S. (Fig.5.2.2.).

5.2.3. Material vegetal

a) Colección de semillas de *S. bigelovii* silvestre

A finales de noviembre, período en cual las plantas maduras de *S. bigelovii* liberan naturalmente sus semillas (Troyo-Diéguez *et al.*, 1994) se llevó a cabo la colecta seleccionando

plantas maduras y secas de una población natural establecida en la costa del poblado El Comitán, B.C.S. (Fig, 5.2.2.). Con la finalidad de separar las semillas maduras, las plantas fueron maceradas en seco y cernidas (200). Se seleccionaron las semillas de mayor tamaño, así como de color uniforme y sin daños aparentes.

b) Semilla de línea avanzada

La semilla mejorada obtenida corresponde al genotipo mejorado “SOS-10”. Dicha semilla fue proporcionada por la compañía Exportadora de Sal (ESSA) de Guerrero, Negro, B.C.S.

5.2.4. Germinación de semillas de *S. bigelovii*

Semillas de *S. bigelovii* tanto silvestre como SOS-10 fueron sometidas a un protocolo de desinfección, por inmersión, con diversas concentraciones de hipoclorito de sodio: 1.5, 3.0 y 6% (v/v). Se encontró que inmersiones de 30 s en una concentración de 3% (v/v) de hipoclorito de sodio, el menor porcentaje de contaminación y un óptimo de germinación fueron iguales o superiores a 85% en comparación con los demás. Este protocolo se aplicó para grupos de 50 semillas de *S. bigelovii*, tanto silvestres como SOS-10, posteriormente fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril. Las semillas se secaron después en papel absorbente esterilizado y se sembraron en cajas de Petri y cultivadas por un período de 30 días, según los tratamientos descritos en la siguiente sección.

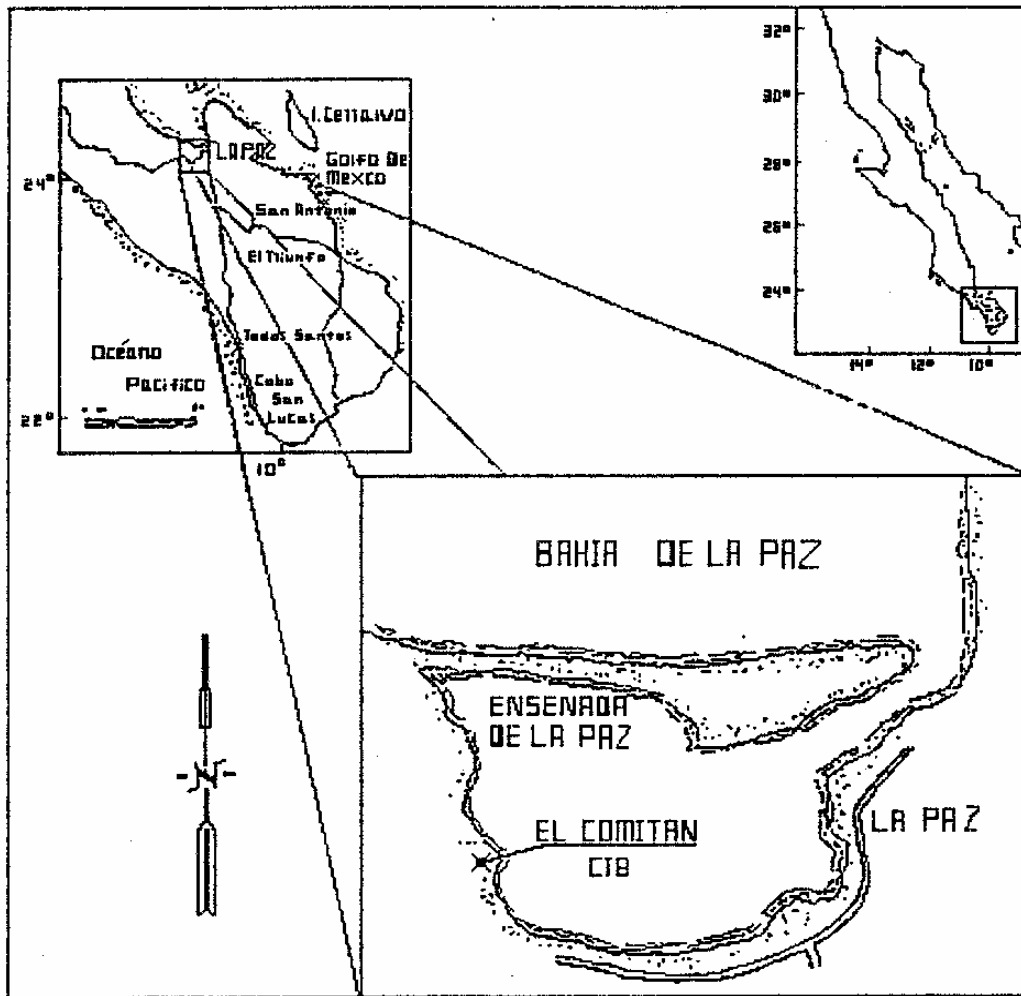


Fig. 5.2.2.- Localización del área de muestreo de plantas de *Salicornia bigelovii* en El Comitán, Bahía de La Paz, B.C.S.

5.2.5 Tratamientos químicos y de biofertilización en semillas de *S. bigelovii*.

Cajas de Petri que contenían 50 semillas de *S. bigelovii*, ya fueran silvestres o SOS-10, fueron cultivadas con los tratamientos descritos en la Tabla 5.2.5. Una descripción breve de estos tratamientos se detalla en las siguientes secciones.

Los factores de estudio y sus niveles enlistados anteriormente, así como las combinaciones posibles producen un total de 18 tratamientos incluyendo el control (2 tipos de semilla x 3 bacterias y un fito-regulador x 3 niveles de salinidad).

5.2.5.1. Inoculación con bacterias y protocolo de germinación

Se prepararon cultivos de las bacterias, que presentaran una fase de crecimiento exponencial (15 h); se realizó un ajuste en los cultivos bacterianos empleando un espectrofotómetro (espectro maestro FISHER SCIENTIFIC 415). La forma en que lo anterior se realizó fue adicionando 1 mL del cultivo en una celda para espectrofotómetro, tomando la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 540 nm y por último se realizó un ajuste previo con el control que fue la solución nutritiva. La suspensión bacteriana fue diluida en el mismo medio nutritivo hasta obtener una absorbancia de 1.00 unidades, correspondiendo a una concentración de 1×10^9 células por mL. En cada uno de los cultivos se colocaron las semillas y en un matraz Kitazato de 250 mL, se sometieron por infiltración al vacío a 600 mm Hg por 5 m (Carrillo *et al.*, 1988). Posteriormente se depositaron 50 semillas en cada una de las cajas Petri, agregando 20 mL de la solución salina correspondiente (0.0, 0.25 y 0.5M NaCl). Los tratamientos se colocaron en una cámara de germinación en condiciones de luz blanca-continua, $27^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ y a $35\% \pm 1\%$ de humedad relativa. Se aplicaron volúmenes

apropiados de 20 mL de agua destilada estéril, así como también de la solución salina, a los tratamientos correspondientes (0.0, 0.25 y 0.5M NaCl) cada 4 días a cada una de las cajas Petri.

Tabla 5.2.5. Aplicación de tratamientos experimentales

Semilla	Inoculante (1×10^9 UFC/mL) o Fitorregulador (8.661×10^{-5} M)	Salinidad (NaCl)
SOS-10	<i>K. pneumoniae</i>	0, 0.25 y 0.5M
SOS-10	<i>A. halopraeferens</i> *	0, 0.25 y 0.5M
SOS-10	Acido giberélico (AG ₃)**	0, 0.25 y 0.5M
SOS-10	Sin inoculante	0, 0.25 y 0.5M
Silvestre	<i>K. pneumoniae</i>	0, 0.25 y 0.5M
Silvestre	<i>A. halopraeferens</i> *	0, 0.25 y 0.5M
Silvestre	Acido giberélico (AG ₃)**	0, 0.25 y 0.5M
Silvestre	Sin inoculante	0, 0.25 y 0.5M

*Control biológico; ** Control químico

5.2.5.2. Cuantificación de semillas germinadas

La tasa de germinación y el porcentaje fueron evaluados mediante la observación de la emergencia de la radícula (2 mm de longitud). El número de semillas germinadas se realizó mediante lecturas diarias (tasa de germinación) y finalmente el porcentaje de germinación fue determinado a los 30 días. La tasa de germinación fue calculada de acuerdo a Maguire (1962) con la ecuación:

$$M = n_1/t_1 + n_2/t_2 + \dots n_{30}/t_{30}$$

Donde $n_1, n_2, \dots n_{30}$ representan el número de semillas germinadas en el tiempo $t_1, t_2, \dots t_{30}$ (en días). El diseño experimental que se empleó fue un completamente al azar con 24 tratamientos

y cinco repeticiones de 50 semillas por repetición. El primer factor (genotipos) tuvo dos niveles (genotipo “silvestre” y genotipo mejorado “SOS-10”), el segundo factor (inoculantes) tuvo cuatro niveles (inoculante con la bacteria *K. pneumoniae*, *A. halopraeferens*, el tratamiento con el fitorregulador sintético BioGib (GBMTM, Saltillo, Coahuila, México- conteniendo 10% de ácido giberélico) al 8.661×10^{-5} M y el tratamiento sin inoculante; y el tercero con tres niveles de NaCl (0, 0.25 y 0.5 M). Utilizando este mismo diseño, se realizaron análisis de varianza del porcentaje de germinación transformando previamente los valores con arcoseno (Sokal y Rohlf, 1988). La tasa de germinación, que es la suma de semillas germinadas contadas por día también fue analizada. La diferencia significativa entre las medias de los tratamientos se evaluó mediante la prueba de Rango Múltiple de Duncan al 0.05%. Los datos fueron analizados mediante utilizando el programa de cómputo SAS (SAS, 1996).

5.2.5.3. Medición de biomasa y longitud de plántulas de *Salicornia bigelovii*.

Treinta y cinco plántulas de cada tratamiento fueron tomadas al azar con la finalidad de medir su altura, longitud de raíz, peso fresco y peso seco al finalizar el experimento (30 días). La longitud de la plántula y de la raíz se realizó con la ayuda de un vernier (General, 143, General Tools, Manufacturing Co., Inc. New York, USA). El peso seco se determinó después de que cada órgano fue secado a 110° C durante 36 horas en horno.

5.2.5.4. Cuantificación de células bacterianas adheridas.

Esta prueba se llevó al cabo al finalizar el estudio (30 días después); para ello se tomaron de cada tratamiento y por separado, siete plántulas (168 plántulas en total), se lavaron con agua destilada estéril y posteriormente se introdujeron a un tubo Eppendorf con agua estéril. Se agitaron con la ayuda de un Vortex durante 1 m lo que permitió el desprendimiento de las bacterias adheridas a la raíz. Posteriormente de ésta solución se tomaron directamente 100 μ L y se sembraron por dispersión en placa en medio OAB libre de nitrógeno (Reinhold *et al.*, 1987). Las cajas de Petri plaqueadas se incubaron a 30° C durante 24 h para cuantificar las unidades formadoras de colonia (UFC·mL). Esta prueba se realizó por triplicado.

Se realizaron análisis de varianza (Snedecor, 1956) para peso fresco, peso seco, longitud de plántula y longitud de raíz, así como las unidades formadoras de colonias por mL (UFC·mL). La diferencia mínima significativa se realizó mediante una Prueba de Rango Múltiple de Duncan al 0.5%. Las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el programa SAS (SAS, 1996).

5.3. EFECTO DE LA BACTERIA *Klebsiella pneumoniae* EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO INICIAL DE *Salicornia bigelovii* (Torr.)

5.3.1. Metas

Para la fase de desarrollo de plántula se planteó como meta el evaluar la bacteria *Klebsiella pneumoniae*, comparado con el control biológico (*Azospirillum halopraeferens*), mediante dos tipos de inoculación: con medio líquido y sólido (esferas). Bajo estos sistemas de inoculación se midió el efecto en la altura de la plántula y la longitud radicular, así como también en el número de células bacterianas adheridas al sistema radicular.

5.3.1.1. Germinación de semilla

Semillas de *Salicornia bigelovii* (SOS-10) fueron depositadas en placas de poliuretano de 200 cavidades (dos semillas por cavidad), que contenían sustrato tipo peat-moss (Sunshine, Sun Gro Horticulture Canada, Ltd.); dichas placas se colocaron en una cámara de germinación a 27°C, 12 h luz (3000 luxes) y 12 h de oscuridad, con riegos diarios a saturación con agua destilada estéril.

5.3.1.2. Transplante de plántulas.

Plántulas de dos centímetros de altura y un centímetro de longitud radicular fueron seleccionadas para ser transplantadas en macetas de 7 cm de altura, utilizando sustrato tipo "peat moss" (Sunshine, Sun Gro Horticulture Canada, Ltd.). Las macetas se cultivaron en las condiciones de 27°C, 12 h luz (3000 luxes) y 12 h de oscuridad, con riegos diarios a saturación

con agua destilada estéril. Los tratamientos experimentales aplicados se enlistan en la Tabla 5.3.1.2

5.3.1.3. Metodología para la preparación de los inóculos

5.3.1.3.1. Inóculo en esferas de alginato de calcio.

5.3.1.3.1.1. Soluciones y Medios de Cultivo

1. Se preparó medio de cultivo OAB, libre de nitrógeno y vaciado matraces Erlenmeyer, cerrados con tapones de gasa y algodón y esterilizados en autoclave a una temperatura de 121°C durante 20 m.
2. La solución salina fue preparada en una concentración de 0.85 % (w/v): Se disolvieron 1.37 g de NaCl en 162 mL de agua destilada, esterilizándose en la autoclave a una temperatura de 121°C por 20 m a 15 libras de presión.
3. Cloruro de Calcio (0.1 M): se disolvieron 2.22 g de CaCl_2 en un volumen de 100 mL de agua, se vertieron en un matraz aforado de 200 mL de agua destilada. Después de aforar al volumen correspondiente, la solución fue vaciada en un matraz Erlenmeyer y tapado con tapones de gasa y algodón se esterilizó en autoclave por 20 m.
4. Buffer de fosfatos 0.2 M (PBS): en 45 ml de agua destilada se disolvieron por separado 2.7218 g de fosfato de potasio monobásico anhidro (KH_2PO_4) y fosfato de potasio dibásico anhidro (K_2HPO_4) y se mezclaron en partes iguales, ajustándose a un pH de 7.0, en un matraz aforado de 100 mL.
5. Etanol 96° y agua destilada estéril.
6. Alginato de sodio al 2% (w/v): 1 g de alginato de sodio fue mezclado con etanol absoluto, en una placa Petri, como método de esterilización. La mezcla se dejó durante 12 h en una

campana con flujo de aire y la luz ultravioleta. Una vez seco, se disolvió en 50 mL de agua estéril y se guardó en un matraz Erlenmeyer esterilizado previamente.

Tabla 5.3.1.2 Tratamientos experimentales aplicados

Tratamiento o inóculo	Forma de inoculación (ó tipo de inoculación)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	inóculo líquido
<i>K. pneumoniae</i> + <i>A. halopraeferens</i>	inóculo líquido
<i>Azospirillum halopraeferens</i> *	inóculo líquido
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Esferas
<i>K. pneumoniae</i> + <i>A. halopraeferens</i>	Esferas
<i>Azospirillum halopraeferens</i> *	Esferas
Esferas de alginato puro	Esferas
Control sin inocular	Agua destilada estéril

*Control biológico

5.3.1.3.1.2. Protocolo de formación de esferas de alginato de sodio y encapsulamiento de bacterias

La encapsulación de bacterias en esferas de alginato de calcio se realizó según Carrillo *et al*, (1988). Las bacterias fueron almacenadas a 4°C en glicerol y fueron reactivadas en medio OAB a 28°C. Veinticuatro horas después de cultivo con agitación constante, se tomó una alícuota y se verificó la pureza del inóculo. Se recultivó la bacteria hasta tener una densidad celular de inóculo de 1×10^9 células mL⁻¹.

El encapsulamiento se realizó adicionando el inóculo lentamente al alginato estéril, el cual se mezcló con agitación continua durante 1 h para preparar la suspensión bacteria-NaAlg y se dejó reposar de 1 a 2 h para eliminar las burbujas de aire creadas durante la agitación.

Posteriormente y con la ayuda de jeringas de 10cm³, la suspensión bacteria-NaAlg se vertió por goteo a una solución de CaCl₂ 0.1M para formar el complejo bacteria-CaAlg y formar la esfera. Las esferas se mantuvieron en la solución de CaCl₂ durante 2 h a 40 rpm. Posteriormente, se midió la cantidad de células presentes por g de esfera, lavándose previamente en agua potable estéril, 1 gr. de esferas. Posteriormente fueron depositadas en un tubo de ensayo con 9 mL de PBS 0.2 M, pH 7± 0.2, durante 1 h hasta su completa disolución. Una vez disueltas y habiendo homogeneizado la dilución, se prepararon diluciones decimales hasta 10⁻⁶ en tubos Eppendorf con 900 µL de NaCl al 0.85%; las dos últimas diluciones se plaquearon por extensión sobre superficie en OAB al 0.5M de NaCl y se mantuvieron a una temperatura de 30 °C por 24 h. Al término de la incubación se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC).

5.3.1.3.1.3. Inóculo en forma líquida

La preparación del inóculo en forma líquida se desarrolló preparando cultivos líquidos bacterianos de las especies *Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens*. El medio utilizado fue el OAB al 0.5M de NaCl, agitándose a 120 rpm a 28° C.

5.3.1.4. Inoculación de la zona radicular de *S. bigelovii* en forma líquida o de esferas.

Una semana después de haber sido transplantadas, se aplicaron las inoculaciones por deposición del inóculo, por una sola ocasión, (un mL de inóculo líquido, un g de esferas), en el perímetro del sistema radicular. Las plántulas se colocaron bajo condiciones de laboratorio a temperatura de 27 ± 3° C y una humedad relativa entre 40 y 60%. Después de 24 h, se inició la aplicación de riegos con agua estéril diariamente.

5.3.1.5. Medición de biomasa y longitud de plántulas de *Salicornia bigelovii*.

Después de la inoculación se llevó a cabo la evaluación semanal para las variables altura y longitud radicular: ésta última se midió utilizando un vernier y de manera similar se midió la longitud de plántula a partir del cuello hasta el apice.

5.3.1.6. Cuantificación de células bacterianas adheridas al sistema radicular de *S. bigelovii*

Semanalmente se seleccionaron cinco plántulas de los diferentes tratamientos; sus raíces previamente lavadas con agua destilada estéril, se cortaron para transferirse a un tubo Eppendorf con agua estéril y se agitaron durante 1 m, para provocar el desprendimiento de las bacterias adheridas a la raíz. De la solución resultante se tomaron 100 μ L que se sembraron por dispersión en placa de medio OAB libre de nitrógeno. Las placas se incubaron a 30 ° C durante 24 h para cuantificar las unidades formadoras de colonia (UFC). Esta prueba se realizó por triplicado.

5.3.1.7. Diseño experimental y análisis estadístico

En el presente trabajo se aplicó un diseño completamente al azar. Se realizaron análisis de varianza y pruebas de comparación múltiple de medias (Duncan $p < 0.05$). Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa de cómputo SAS (SAS, 1996).

5.4. EVALUACIÓN DE *Salicornia bigelovii* CON LA INOCULACIÓN DE *Klebsiella pneumoniae* BAJO CONDICIONES DE CAMPO

5.4.1. Metas

1.- Evaluar el efecto en variables de crecimiento, fenología y producción de semillas del microorganismo fijador de nitrógeno *Klebsiella pneumoniae* comparado con el control biológico *Azospirillum halopraeferens* al aplicarse a dos genotipos de *Salicornia bigelovii* (SOS-10 y Silvestre).

2.- Evaluar en todo el ciclo biológico de *S. bigelovii* las siguientes variables:

Porcentaje de germinación, tasa de germinación, altura, biomasa, floración, producción de semilla, tipos y proporciones de ácidos grasos en la semilla (determinación cualitativa y cuantitativa de los ácidos grasos palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico).

5.4.2. Establecimiento del cultivo de *S. bigelovii*

El estudio fue desarrollado en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) localizado en una zona árida de Baja California Sur, a 17 Km NW de la Paz, México (24 08 N 110 24 W). Los tratamientos que fueron evaluados en este estudio corresponden a dos genotipos de semilla de *Salicornia bigelovii* (SOS-10 y silvestre), donde el primer genotipo fue proporcionado por la empresa Exportadora de Sal (ESSA) de Guerrero Negro, B.C.S. y el segundo colectado de plantas maduras de *S. bigelovii*, en una zona donde se desarrolla en forma natural, en la costa del poblado “El Comitan”, B.C.S., ubicada en las coordenadas 24 10N y 110W. En ambos genotipos se evaluó el efecto de la inoculación de la zona radicular con las bacterias fijadoras de nitrógeno: *Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens*, bajo condiciones de campo. Previo a la siembra, la semilla silvestre fue

cribada con la finalidad de separar las semillas maduras, depurándolas del material vegetativo seco para seleccionar las semillas de mayor tamaño, color uniforme y sin daños aparentes. Posteriormente las semillas de *S. bigelovii* tanto silvestre como SOS-10 fueron sometidas a una desinfección, realizando una inmersión en hipoclorito de sodio durante 30 s en una concentración de 3% (v/v). Posteriormente fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril. Las semillas se secaron después en papel absorbente esterilizado.

5.4.3. Inoculación de la semilla de *S. bigelovii* (SOS-10 y silvestre) con las bacterias *Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens*

Bacterias de *K. pneumoniae* y *A. halopraeferens* de manera independiente fueron desarrollados en medio líquido OAB con 0.5 M de NaCl. Las condiciones de incubación fueron en agitación continua (120 rpm) y a una temperatura de 30°C (Reinhold *et al.*, 1987). Entre las 14 y 16 h (fase logarítmica) transcurridas, se determinó la concentración del cultivo de cada bacteria, de acuerdo al siguiente procedimiento: 1 mL del cultivo se vertió en una celda para espectrofotómetro (espectro maestro FISHER SCIENTIFIC 415), tomando la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 540 nm contra un control de medio OAB líquido con 0.5 M de NaCl sin bacterias. La suspensión bacteriana se diluyó hasta obtener una absorbancia de 1.00 unidad, que corresponde a una concentración de 1×10^9 UFC/mL. A cada uno de los cultivos (Tabla 5.4.3.) se adicionaron 0.5 g (590 semillas \pm 7) de cada uno de los genotipos y en un matraz Kitazato de 50 mL se sometieron a vacío a 600 mm Hg por 5 m (Carrillo *et al.*, 1988).

Después de este tiempo, las semillas inoculadas por infiltración al vacío de *Klebsiella pneumoniae* o de *Azospirillum halopraeferens*, se depositaron en placas germinadoras de 1 m²

que contenían 7 cm de sustrato de arena fina. Posteriormente la semilla fue cubierta con una capa fina (3 mm \pm 1) de sustrato tipo peat-moss (Sunshine, Sun Gro Horticulture Canada, Ltd.). Las placas germinadoras se colocaron a la intemperie (cielo abierto). Durante 1 mes se llevó a cabo riego con agua potable, por saturación, diariamente.

5.4.4. Establecimiento de plántulas en el campo agrícola.

Un mes después de obtener las plántulas germinadas correspondientes a cada uno de los tratamientos, fueron trasplantadas en condiciones de campo en microcuencas de un área de 1 m², con el fin de evitar un daño mecánico al sistema radicular y una posible entrada de patógenos del suelo. Se establecieron 60 plantas en cada microcuenca a una distancia entre plantas de 10 cm y entre hileras de 15 cm.

Tabla 5.4.3. Tratamientos experimentales correspondientes a dos genotipos (SOS-10 y silvestre) inoculados con bacterias fijadoras de nitrógeno (*Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens*) bajo condiciones de campo.

Semilla	Bacteria (inoculantes)
SOS-10	<i>K. pneumoniae</i>
SOS-10	<i>A. halopraeferens</i> *
SOS-10	Sin inoculante
silvestre	<i>K. pneumoniae</i>
silvestre	<i>A. halopraeferens</i> *
silvestre	Sin inoculante

*Control biológico

5.4.5. Inoculación de *Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens*, vía sólida en esferas de alginato, en dos diferentes etapas vegetativas (Plántula, y floración)

5.4.5.1. Inoculación del sistema radicular vía sólida en esferas de alginato de calcio.

El programa de fertilización por inoculación vía sólida, en forma de esferas de alginato de calcio durante el desarrollo vegetativo de *S. bigelovii*, se realizó depositando con la ayuda de una espátula, un gramo de esferas que contenían *K. pneumoniae* o *A. halopraeferens*, de acuerdo con los tratamientos a estudiar. En la Tabla 5.4.5.1 se indica la calendarización de las inoculaciones de las bacterias fijadoras de nitrógeno en estudio.

5.4.5.2. Programa de riegos

Durante el primer mes de desarrollo vegetativo de la planta (germinación y desarrollo de plántula) se irrigaron las plántulas con agua potable. La frecuencia de riegos en esta etapa fue cada tercer día, aplicando un riego de $55 \text{ L m}^{-2} \pm 5$. En la tabla 5.4.5.2, se indican las propiedades del agua utilizada. En esta etapa el sistema de riego que se utilizó fue el de anegamiento. En el caso de experimentación con irrigación con soluciones salinas, una semana antes del trasplante, las plántulas se fueron adaptando a agua salina, incrementando la salinidad paulatinamente. Después del trasplante, las plantas fueron irrigadas diariamente durante todo el ciclo fenológico de la planta con agua salina. Cabe indicar que el agua salina procedía de un pozo de agua subterránea (11 m) al nivel freático que se encuentra situado en las instalaciones del CIBNOR, cuyas propiedades se indican en la tabla 5.4.5.2. El sistema de riego que se

Tabla 5.4.5.1 Programa de inoculación de esferas de alginato con bacterias fijadoras de nitrógeno (*K. pneumoniae* y *A. halopraeferens*) a dos genotipos de *S. bigelovii* (SOS-10 y silvestre) bajo condiciones de campo en la Paz, B.C.S. (CIBNOR).

Semilla	Bacteria 1×10^7	Etapa fenológica	Días después de la siembra
SOS-10	<i>K. pneumoniae</i>	Plántula	34
		Desarrollo de ramas laterales	120
		Prefloración	180
		Floración	210
SOS-10	<i>A. halopraeferens</i> *	Plántula	34
		Desarrollo de ramas laterales	120
		Prefloración	180
		Floración	210
SOS-10	<i>Sin inoculante</i>	Plántula	34
		Desarrollo de ramas laterales	120
		Prefloración	180
		Floración	210
Silvestre	<i>Pneumoniae</i>	Plántula	34
		Desarrollo de ramas laterales	120
		Prefloración	180
		Floración	210
Silvestre	<i>A. halopraeferens</i> *	Plántula	34
		Desarrollo de ramas laterales	120
		Prefloración	180
		Floración	210
Silvestre	<i>Sin inoculante</i>	Plántula	34
		Desarrollo de ramas laterales	120
		Prefloración	180
		Floración	210

*Control biológico

Tabla 5.4.5.2. Calidad del agua utilizada en la irrigación de *S. bigelovii* (SOS-10 y silvestre) inoculadas con bacterias fijadoras de nitrógeno (*K. pneumoniae* y *A. halopraeferens*) bajo condiciones de campo, en la Paz, B. C. S.

Tipo de agua	pH	Salinidad ppm	C.E. w dS/m	Nitritos (NO ₂) μm/L	Nitratos (NO ₃) μm/L
Agua dulce o potable	7.00	0.8	1,194	0.108 - 0.114	87.27-94.17
Agua salina	8.00	7.49	11,170	0.322 - 0.328	6.22 – 6.65

Fuente: Laboratorio de Biogeoquímica del CIBNOR.



Fig. 5.4.5.2. Sistema de riego por aspersión desarrollado para *Salicornia bigelovii* bajo condiciones de campo en CIBNOR. La Paz, B.C.S.

utilizó en las microcuencas fue de tipo aspersion, aplicando una lámina de riego de 65 L \pm 5 por 30 m por microcuenca (Fig. 5.4.5.2.)

5.4.5.3. Condiciones microbiológicas del suelo

Con la finalidad de conocer el estado microbiológico desde el punto de vista fitopatológico (bacterias, hongos y nemátodos) del suelo, se aplicaron técnicas de detección según Thorne (1961), Manovsky (1982), Nickle (1991), en muestras de suelo (5 sitios de muestreo) del área total de las micro-cuencas (SARH-SAGARPA, 1994).

5.4.5.4. Condiciones ambientales durante el desarrollo del cultivo.

En la tabla 5.4.5.4. se presentan los valores promedio mensuales de la temperatura ($^{\circ}$ C), Humedad relativa (H.r.), Insolación y Radiación Fotosintéticamente Activa que se presentaron durante el desarrollo del cultivo de *Salicornia bigelovii* (SOS-10 y silvestre) inoculados con bacterias fijadoras de nitrógeno (*K. pneumoniae* y *A. halopraeferens*), bajo condiciones de campo en la Paz, B.C.S. (CIBNOR).

5.4.5.5. Variables evaluadas durante el ciclo agrícola de *S.*

bigelovii.

La tasa y el porcentaje de germinación fueron considerados una vez emergida las plántulas del sustrato. El número de semillas germinadas se realizó con lecturas cada tercer día (tasa de germinación) y finalmente el porcentaje de germinación (%) se determinó a los a los 24 días. La tasa de germinación se calculó de acuerdo a (Maguire, 1962) mediante la ecuación:

$$M = n_1/t_1 + n_2/t_2 + \dots n_{24}/t_{24}$$

Donde $n_1, n_2, \dots n_{24}$ corresponden al número de semillas germinadas en el tiempo $t_1, t_2, \dots t_8$ (en días). Se realizaron análisis de varianza. Transformando los datos de porcentaje de germinación mediante arcoseno (Sokal y Rohlf, 1988). La tasa de germinación, la cual es la suma de semillas germinadas contadas por día, no fue transformada previamente para su análisis. Durante todo el ciclo fenológico de las plantas, treinta y cinco plántulas de cada tratamiento fueron seleccionadas al azar con la finalidad de medir su altura mensualmente.

En el estado fenológico de floración, el contenido de nitratos en savia ($(N-NO_3 \text{ mg mL}^{-1}$ de savia) fue obtenido mediante la técnica de Coombs (1988) y analizado según Wood (1967). La longitud de raíz, peso fresco y peso seco por planta, fue determinada también en esta etapa fenológica. La longitud de la plántula y de la raíz se midieron con la ayuda de un vernier electrónico (General, 143, General Tools, Manufacturing Co., Inc. New York, USA). El peso seco fue determinado después de que cada órgano fue secado a 110° C durante 36 horas en estufa de circulación de aire forzado. Para las anteriores variables se consideraron 5 repeticiones por tratamiento. Cabe indicar que la variable número de días a floración se realizó cuantificando cada 10 días el número de plantas en estado de floración para ello, la fecha de floración fue considerando un 50% de plantas floreciendo.

En esta misma etapa fueron seleccionadas cinco plantas por tratamiento, las cuales se seccionaron en tres partes obteniendo raíz, tallo y parte aérea. El tallo se definió considerando los tres primeros artículos desde la base del tallo juntamente con sus ramas laterales. La parte aérea fue considerada a partir del cuarto artículo en adelante.

Tabla 5.4.5.4. Condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa, horas sol y radiación fotosintéticamente activa) presentes en el estudio de dos genotipos de *S. bigelovii* (SOS-10 y silvestre) inoculadas con bacterias fijadoras de nitrógeno (*K. pneumoniae* y *A. halopraeferens*) bajo condiciones de campo, en la Paz, B.C.S.

Mes (2000-2001)	Temperatura media mensual °C	Humedad relativa (h.r.)	Insola- ción media mensual horas	Radiación fotosinté- ticamente activa ($\text{me} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)
Diciembre	19.6 ± 3	65	7	347.37
Enero	18.2 ± 4	66	6	325.82
Febrero	19.5 ± 4	63	7	400.19
Marzo	20.4 ± 5	60	6	501.81
Abril	23.5 ± 4	54	10	534.29
Mayo	25.5 ± 4	54	10	539.30
Junio	29.7 ± 4	50	11	550.6
Julio	30.5 ± 5	49	10	543.6
Agosto	31.3 ± 5	64	9	488.36
Septiembre	32.2 ± 4	---	9	480.3

Fuente: Comisión Nacional del agua. La Paz, B.C.S. (2001).

Las variables evaluadas fueron: contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos totales y cenizas. La técnica para obtener proteínas se desarrolló por el método microkjeldajl; para cenizas por diferencia de peso, calcinando la muestra a 500° C por 24 h y con relación a los lípidos totales se empleó la técnica de Barnes and Blachstocks (1973).

Al finalizar el ciclo vegetativo, 10 plantas por tratamiento fueron elegidas al azar para cuantificar la variable producción de semilla por planta (g planta^{-1}). Para la variable producción de semilla por m^2 (producción de semilla g m^{-2}) de cada tratamiento, el valor se determinó multiplicando el promedio obtenido de producción de semilla por planta por el número total de

plantas que se sembraron por micro cuenca (60). Se evaluó la materia seca producida por micro cuenca (materia seca en g m^{-2}). Asimismo, las muestras de semillas producidas en cada uno de los tratamientos fueron analizadas para la cuantificación de proteína, humedad, ceniza y lípidos totales. Cabe indicar que dentro de esta última variable, se obtuvo el porcentaje absoluto de ácidos grasos (palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico) aplicándose para estos análisis, la técnica sugerida por Bligg y Dyer (1959), modificada por Arredondo *et al.*, (1997). Para la correspondiente derivación de ácidos grasos, se aplicó la técnica de Sato y Murata, (1988).

Se realizaron análisis de varianza (Snedecor, 1956). Los datos de humedad, proteínas, cenizas y ácidos grasos (expresados en porcentaje) en etapa de floración y cosecha fueron transformados previamente mediante arcoseno (Sokal y Rohlf, 1988). La diferencia mínima significativa se realizó mediante una Prueba de Rango Múltiple de Duncan ($= 0.05\%$). Los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico SAS (SAS, 1996).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. DETECCIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO EN LA RIZÓSFERA DE *Salicornia bigelovii* (Torr.)

6.1.1. Aislamiento de bacterias de la rizósfera

El análisis microbiológico de la rizósfera de *Salicornia bigelovii*, llevado a cabo en dos etapas vegetativas de su desarrollo (plántula y planta madura) y en los cinco lugares muestreados, presentó un número similar de morfotipos bacterianos. Por su parte, Ungar., (2000) ha discurrido que una heterogeneidad en parámetros ambientales, e.g. de tipo físico, químico y bióticos, inducen variabilidad y composición en la estructura microbiana de la rizósfera. En el presente estudio, los análisis de suelo muestran que al menos los parámetros físicos como textura de suelo y los químicos como conductividad eléctrica, contenido de aniones y cationes, etc., son similares en cada sitio de muestreo (Tabla 6.1.1.A), por lo que la similitud en morfología bacteriana es explicada. Por otra parte, el crecimiento de los aislados bacterianos fue óptimo cuando el medio de cultivo fue complementado con 0.5M de NaCl. En total 18 morfotipos fueron aislados y purificados de la rizósfera de *S. bigelovii* (Tabla 6.1.1.B).

6.1.1.1 Actividad de Nitrogenasa (prueba de reducción de acetileno)

La totalidad de los 18 aislados bacterianos presentó la capacidad de reducir el acetileno. Sin embargo, 17 mostraron una actividad muy baja, mientras que sólo una mostró una alta actividad de reducción de acetileno, similar a la del control biológico: *A. halopraeferens* (Fig. 6.1.1.1.A y 6.1.1.1.B). La cinética de crecimiento del aislado bacteriano fijador de nitrógeno

(Fig. 6.1.1.1.C) presentó una disminución de crecimiento, entre las 14 y 16 h de cultivo, muy similar a la presentada por *A. halopraeferens* (Puente *et al.*, 1999).

Tabla 6.1.1.A. Parámetros físicos y químicos de suelo asociado a rizósfera de *Salicornia bigelovii* muestreada en la Bahía de la Paz, B.C.S. para el aislamiento de bacterias fijadoras de N₂.

Punto de muestreo	Textura	M.O. %	pH	CE dS/m	RAS	NO ₃ mg/Kg	NO ₂ mg/Kg	Ca mg/Kg	Mg mg/Kg	K g/L	Na g/L
CIBNOR	Arenoso/limoso	0.51	7.04	8.4	13.08	0.27	0.10	178.7	328.1	0.1	3.9
El Comitán	Arenoso/limoso	0.66	7.04	5.5	10.82	0.09	0.10	85.80	199.36	0.1	3.6
CETMar Carretera al norte de la ciudad de La Paz	Arenoso/limoso	0.39	7.36	8.7	12.44	0.99	0.24	193.0	317.15	0.1	3.5
Unidad Pichilingue (UABCS)	Arenoso/limoso	0.41	6.31	7.95	11.97	0.32	0.06	145.0	258.92	0.1	3.2
		0.17	6.95	4.41	11.43	0.42	0.08	77.0	136.0	0.08	3.0

CE= Conductividad electrica
NO₃=Nitratos
Ca=calcio

RAS= relación absorción sodio
NO₂=Nitritos
Mg= Magnesio
NH₄= Amonio
K=potasio

Tabla 6.1.1.B. Características morfológicas de los aislamientos bacterianos en rizósfera de *Salicornia bigelovii* de la Bahía de La Paz, B.C.S.

Aislamiento bacteriano No.	Color	Consistencia	Apariencia	Superficie	Elevación	Crecimiento	Motilidad	Tinción Gran	Forma
1	Amarilla	Creмоса-Abundante	Húmeda	Lisa	Convexa	Rápido	Rápida-vibroide	-	Bacilo corto
2	Blanca-transparente	Creмоса	Húmeda	Lisa	Convexa	Lento	Rápido en forma de cruz	-	Bacilo corto
3	Naranja-brillante	Creмоса	Húmeda	Lisa	Convexa	Lento	Rápido	-	Bacilo largo
4	Blanca-verduzca	Creмоса-abundante	Húmeda	Lisa	Convexa	Rápido	Muy lento	-	Bacilo largo
5	Blanca	Creмоса-abundante	Húmeda	Lisa	Convexa	Rápido	Rápido	-	Bacilo corto
6	Blanca-opaca con halo tenue	Creмоса	Húmeda	Lisa	Plana	Rápido	Rápido	-	Bacilo corto
7	Naranja-brillantes-transparente	Cristalina-cremosa	Húmeda	Lisa	Convexa	Rápido	Muy rápido	-	Bacilo corto
8	Naranja-opaca	Creмоса	Húmeda	Lisa	Plana	Lento	Muy rápido	-	Bacilo corto
9	Amarilla-brillante con halo	Creмоса	Húmeda	Lisa	Convexa	Rápido	Lento	-	Bacilo corto
10	Blanca	Creмоса	Húmeda	Lisa	Plana	Lento	Lento	-	Bacilo largo
11	Amarilla-brillante	Creмоса	Húmeda	Lisa	Convexa	Rápido	Rápido	-	Bacilo largo
12	Naranja	Creмоса	Húmeda	Lisa	Convexa	Rápido	Rápido	-	Bacilo largo
13	Blanca-transparente	Transparente	Húmeda	Lisa	Plana	Rápido	Rápido	-	Bacilo corto
14	Rosa brillante	Brillante	Húmeda	Lisa	Convexa	Rápido	Rápido	-	Bacilo corto
15	Blanca	Creмоса-abundante	Húmeda	Lisa	Convexa	Rápido	Rápido	-	Bacilo corto
16	Blanca-amarilla	Transparente	Húmeda	Lisa	Plana	Rápido	Rápido	-	Bacilo corto

Aislamiento bacteriano No.	Color	Consistencia	Apariencia	Superficie	Elevación	Crecimiento	Motilidad	Tinción Gran	Forma
17	Naranja	Creмоса	Húmeda	Lisa	Convexa	Rápido	Rápido	-	Bacilo corto
18	Blanca DMC	Creмоса	Húmeda	Lisa	Convexa	Lento	ND	ND	Bacilo corto

Crecimiento rápido= presencia visual de colonia antes de 24 hrs de incubación en medio de cultivo OAB al 0.5M de NaCl

Crecimiento lento= presencia visual de colonia después de 36 hrs de incubación en medio de cultivo OAB al 0.5M de NaCl

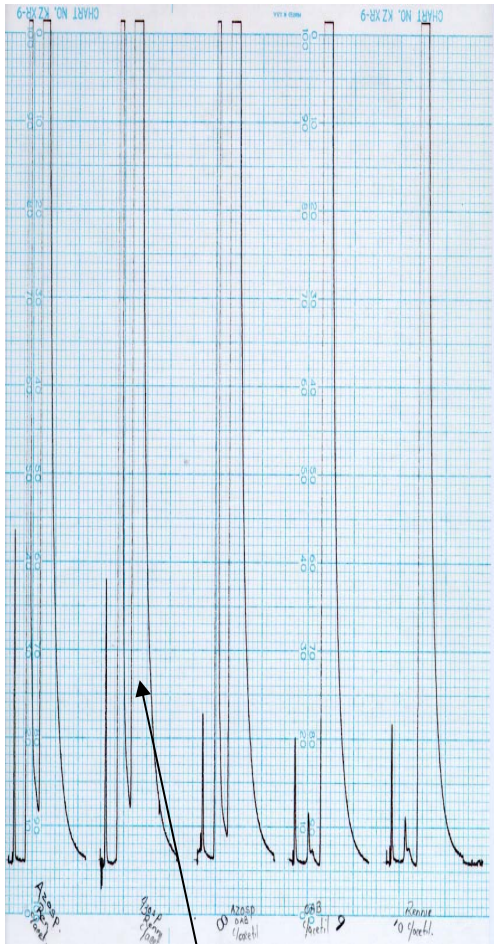
Gram negativa = -

ND=no determinada

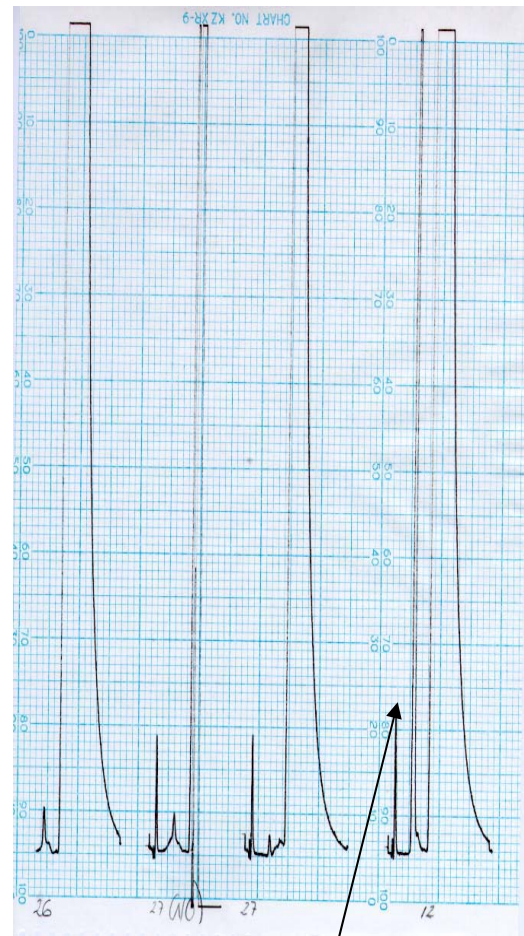
DMC= degradación de medio de cultivo

6.1.1.2. Caracterización e identificación del aislado bacteriano fijador de nitrógeno

La caracterización e identificación de la bacteria con alta actividad reductora de acetileno fueron realizadas mediante pruebas bioquímicas, identificación de ácidos grasos metil esterres y por medio de secuenciación del DNA que codifica para el RNA ribosomal 16S. Los resultados de estas pruebas indican que el aislado es similar al género y especie *Klebsiella pneumoniae* (Fig. 6.1.1.2.a y 6.1.1.2.b), (afinidad del 0.998% en su secuencia del DNA 16S). Dicho microorganismo se encuentra en forma natural en suelo y agua así como también asociada a plantas de manera endófitas (Ladha *et al.*, 1983; Das, 1991; Bredha *et al.*, 1994; Shloter y Hartmann, 1998; Chelius y Triplett, 2000).



A. halopraeferens



Cepa asociada con alta actividad

Fig. 6.1.1.1.A. Cromatograma mostrando la actividad de reducción de acetileno de la bacteria asociada a *S. bigelovii*, comparándola con el control *Azospirillum halopraeferens*.

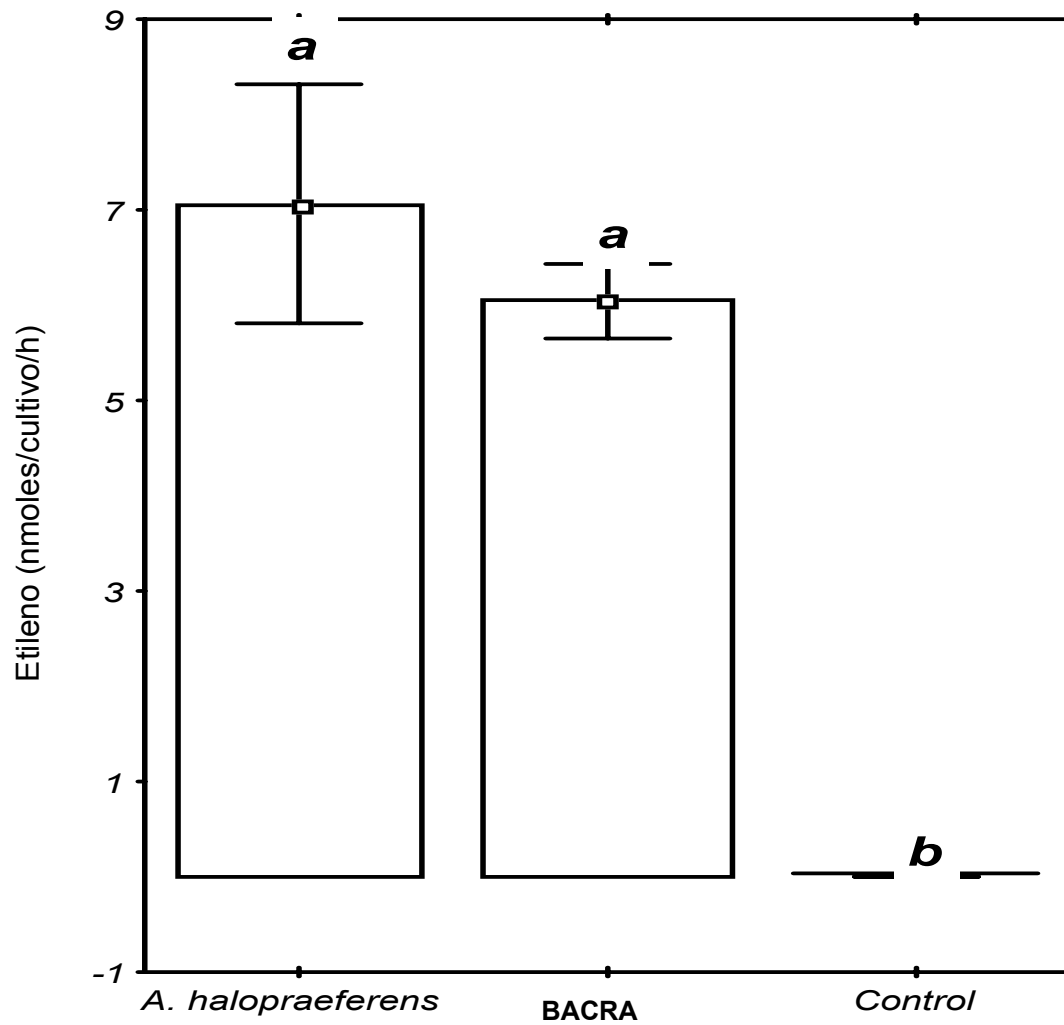


Fig. 6.1.1.1.B. Fijación de nitrógeno (reducción de acetileno) de cultivos de la bacteria fijadora de nitrógeno (BACRA), asociada a la rizósfera de *S. bigelovii*, comparada con el control *A. halopraeferens*.

Barras denotadas por una letra diferente, indican una diferencia significativa ($P < 0.05$).

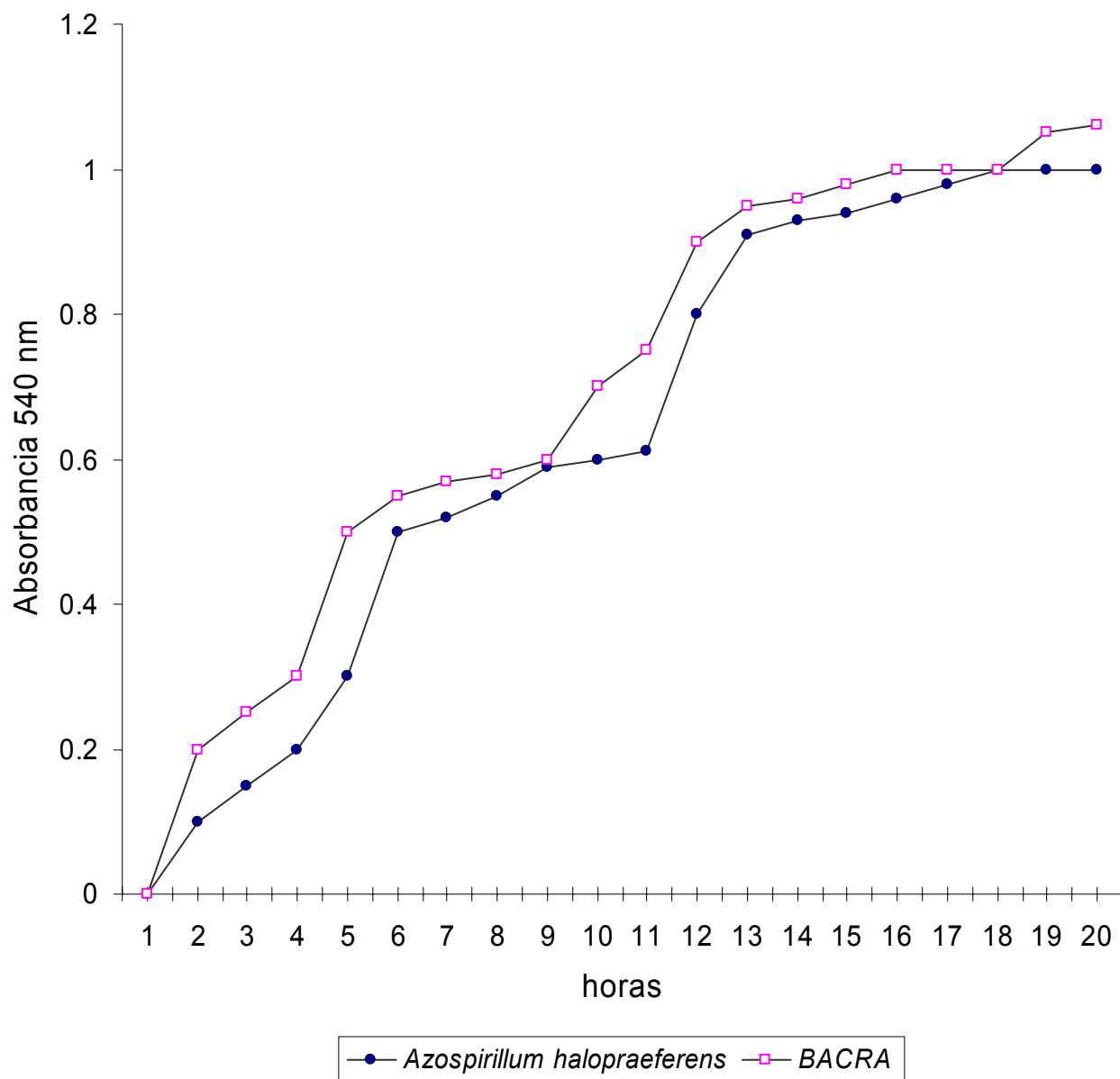
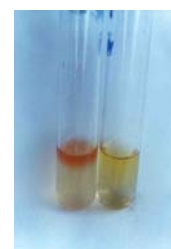


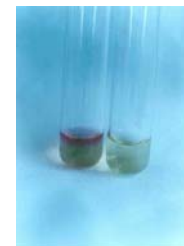
Fig. 6.1.1.1.C.- Cinética de crecimiento de la bacteria con alta actividad de reducción de acetileno (BACRA), asociada a rizosfera de *S. bigelovii* comparada con el control *A. halopraeferens*.

Pruebas Bioquímicas

Producción de ácido de glucosa anaeróbicamente	Prueba de Indol	Prueba rojo de metilo
--	-----------------	-----------------------



Prueba de acidez a 48 h. aeróbicamente	Citrato de Simmons	Reacción de Vogges-Praskauer
--	--------------------	------------------------------



Producción de gas de lactosa, (prueba de coliforme fecales 44° C)	Prueba de motilidad
---	---------------------



Fig. 6.1.1.2.a. Pruebas bioquímicas realizadas a la cepa fijadora de N_2 (alta actividad de reducción de acetileno- BACRA) asociada a rizósfera *S. bigelovii*, de acuerdo a Mc Faddin (1991).

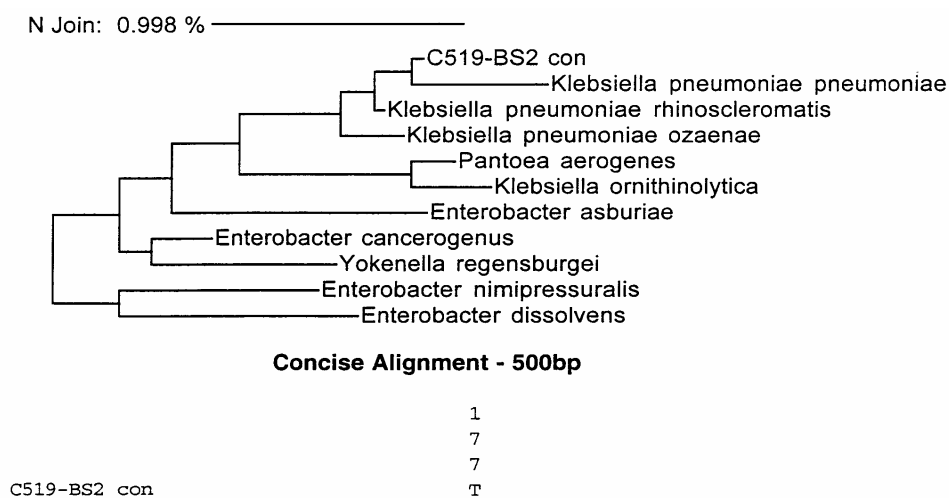


Fig. 6.1.1.2.b.- Identificación 16S rRNA, de la bacteria fijadora de nitrógeno aislada de la rizósfera de *Salicornia bigelovii*.

6.1.2. Perfil de la población bacteriana no cultivable asociada a rizósfera de *Salicornia bigelovii* mediante el análisis del polimorfismo en la conformación de cadena simple de DNA (single strand conformation polymorphism: SSCP)

Mediante la metodología del SSCP, los resultados muestran una diversidad de microflora asociada a rizósfera de *Salicornia bigelovii*. (Fig. 6.1.2 y Tabla 6.1.2).

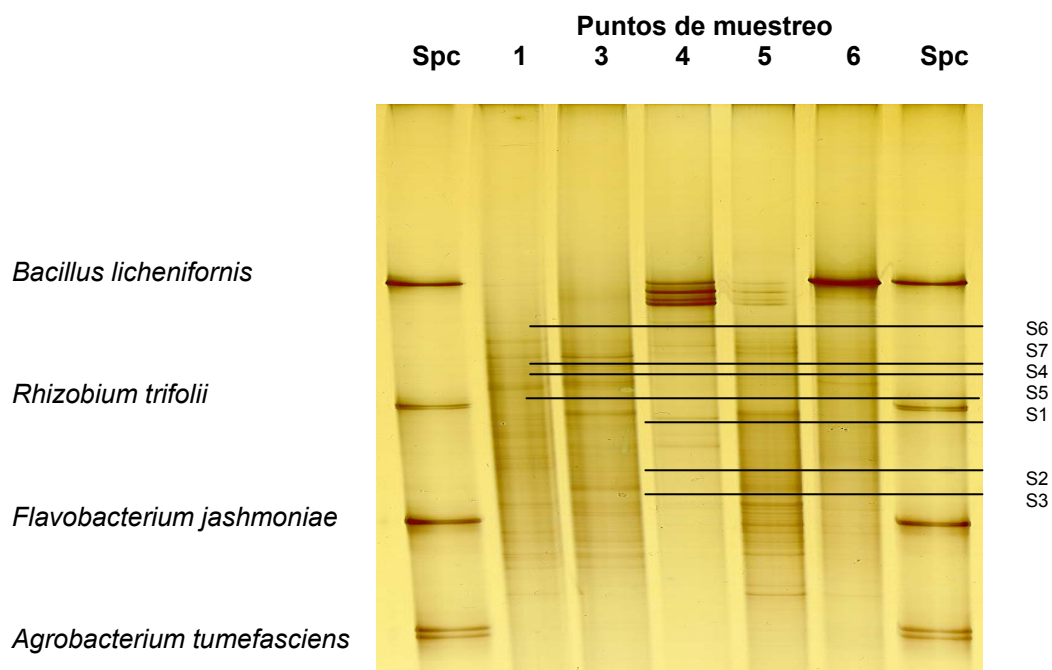


Fig. 6.1.2. SSCP de los fragmentos del DNA ribosomal 16s amplificado por PCR a partir de la microflora asociada a rizósfera de *Salicornia bigelovii*.

Puntos de muestreo: 1= CIBNOR; 2= Comitán; 3=CETMar La Paz; 4= carretera al norte de la cd. de la Paz 5= Extensión UABCS; 6= Tecolote.

Spc= especies control

La secuenciación de los productos amplificados de cadena sencilla corresponden a microorganismos que ya han sido reportados en otros ambientes (Tabla 6.1.2.) y que, aunque en bajas poblaciones, pueden estar realizando un papel sumamente importante en estos ambientes donde se desarrolla la halófito *Salicornia bigelovii*.

Tabla 6.1.2. Resultados de caracterización (% similitud) de las bacterias asociadas a rizósfera de *Salicornia bigelovii* en la Bahía de La Paz, Baja California Sur, México.

Clona No.	Microorganismo	Grupo	Similitud (%)	Habitat	Publicación
S1	Bacteria no indentificada	Cianobacteria	97.7	Suelos Amazonenses	Boerneman J. Janson S. Lyra C.
	<i>Trichodesmium thiebautii</i>	Cianobacteria	88.8		
	<i>Cylindrospermum</i> sp				
S2	Bacteria marina		98.5	Estanques	Hold G.L. Esham E.C. Hamada T.(no publicada)
	Bacteria degradadora de ácidos húmicos	Proteobacteria	98.3		
	Proteobacteria		98.3		
S3	<i>Bacillus</i> sp	Bacillus/Clostri.	99.4	Zacatales	Suzuki H. Felske A. Nogi Y.
	Especies bacterianas	Bacillus/Clostr.	99		
S4	<i>Rhizobium</i> sp.	Proteobacteria	98	Campos de minas	Macur R.E Kaneko T. Sullivan J.T.
	<i>Mesorhizobium loti</i>	Proteobacteria	96.8		
	<i>Rhizobium lotii</i>	Proteobacteria	96.8		
S5	Bacteria no cultivada	Verrucomicrobi	88.5	Costas marinas	Bowman J.P. Janssen P.H. Janssen P.H.
	Ultramicrobacterium str.	Verrucomicrobi	87.3	Arrozales anoxico	
	Ultramicrobacterium str.	Verrucomicrobi	87.3	Arrozales anoxico	
S6	Bacteria no cultivada		95.3	Mar glacial	Brown M.V. Bowman J.P. Brown M.V.
	Bacteria no cultivada	CFB group	95.3	Costas marinas	
	Bacteria no cultivada		95.3	Mar glacial	
S7	<i>Rhizobium</i> sp.	Proteobacteria	97.3	Native shrubby	Van Berkum P.B. Ulrich A. Lafay B.
	<i>Rhizobium</i> sp	Proteobacteria	97.3		
	<i>Rhizobium</i> sp	Proteobacteria	97.3		

Evidentemente los resultados con esta metodología son importantes porque pueden informarnos de la presencia de una gran cantidad de poblaciones microbianas no cultivables, y complementadas con las tradicionales técnicas de cultivo pueden ampliar nuestra visión y conocimiento sobre los eventos de origen microbiano donde destacan la descomposición de materia orgánica, disponibilidad de nutrientes, reducción de toxicidad por metales tóxicos,

modificaciones en el pH, y producción y/o estimulación de fitohormonas, entre otras (El-Shatanawi *et al.*, 2001).

6.2. INFLUENCIA DE LA BACTERIA *Klebsiella pneumoniae* EN LA GERMINACIÓN DE *S. bigelovii* SILVESTRE Y *cv.* SOS-10.

6.2.1. Porcentaje de germinación en genotipo mejorado SOS-10

El análisis estadístico indica que entre los tratamientos estudiados se encontró una diferencia significativa con $P < 0.05$, donde *K. pneumoniae* y el control biológico *A. halopraeferens*, estimularon la germinación de *S. bigelovii cv.* SOS-10 en ausencia de NaCl (Fig 6.2.1.A), en un 30 y 40 % respectivamente comparado con el control sin inoculante. Se observó también que conforme aumenta la salinidad, ambos inoculantes en presencia de NaCl, el efecto ejercido por las bacterias disminuyó en dicho proceso. Sin embargo, el ácido giberélico influyó positivamente en la germinación.

6.2.2. Porcentaje de germinación en genotipo silvestre

La germinación del genotipo silvestre de *S. bigelovii* mostro un porcentaje de germinación bajo. El efecto tanto de *Klebsiella pneumoniae* como de *A. halopraeferens* fue positivo en la germinación en ausencia de salinidad (Fig. 6.2.1. B). Se observó también que en este genotipo conforme aumentó la salinidad, el efecto por el ácido giberélico influyó

positivamente en la germinación, mientras que el efecto de las bacterias en la germinación disminuyó al incrementar las concentraciones de NaCl; sin embargo, el efecto para los tratamientos con bacterias no fue tan drástico como lo fue para el control.

6.2.3. Efecto en el crecimiento radicular en ambos genotipos

Se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$) entre las bacterias en estudio y entre las salinidades. Se observó que en la interacción, el tratamiento con *A. halopraeferens* presentó las longitudes radiculares mayores con respecto a los demás tratamientos, seguida de la fitohormona (AG₃) y *K. pneumoniae*. Sin embargo, al igual que en la variable germinación, el efecto se redujo por la salinidad, con excepción de que el ácido giberélico promovió ligeramente en el cultivar mejorado la longitud radicular a 0.5 M comparado con los otros tratamientos en la misma salinidad (Tabla 6.2.3)

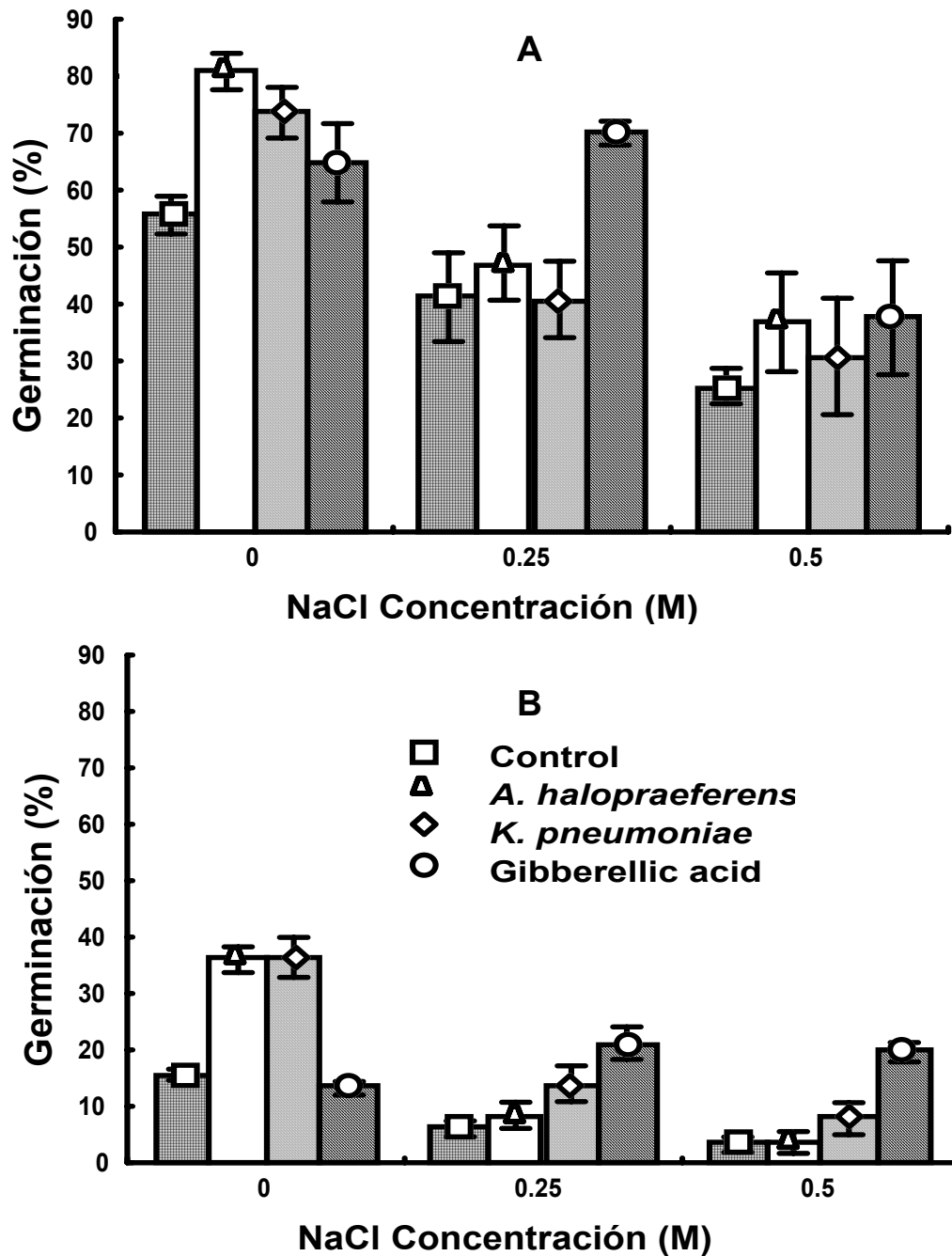


Fig. 6.2.1. Efecto de *K. pneumoniae*, control biológico (*A. halopraeferens*), y el control químico (fitorregulador AG₃), bajo tres concentraciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 M) en la germinación de dos genotipos: de *S. bigelovii* (A) 'SOS-10' y (B) 'silvestre'. Las barras representan el error estándar de las media.

Tabla 6.2.3. Efecto de *Klebsiella pneumoniae*, control biológico (*Azospirillum halopraeferens*), y el control químico (fitorregulador AG₃), bajo tres concentraciones de NaCl. Los valores son los promedios de longitud de raíz, altura de plántula, peso fresco y peso seco en *Salicornia bigelovii* (genotipo ‘SOS-10’ y ‘genotipo silvestre’).

Genotipos	Inoculante Bacteria* o AG ₃ **	NaCl (M)	Long. radicular (cm)	Altura (cm)	Peso fresco (mg)	Peso seco (mg)
SOS-10	control	0	0.55 cd	0.05 m	14.29 fgh	1.93 cd
SOS-10	control	0.25	0.20 hij	0.02 m	16.52 defg	1.24 ghi
SOS-10	control	0.5	0.15 ijk	0.06 m	14.34 fgh	1.18 hi
SOS-10	<i>A. halopraeferens</i>	0	1.02 a	1.89 a	28.82 a	2.30 b
SOS-10	<i>A. halopraeferens</i>	0.25	0.48 de	0.81 hij	22.71 b	2.08 bc
SOS-10	<i>A. halopraeferens</i>	0.5	0.29 fg	0.76 ij	17.65 de	2.23 b
SOS-10	<i>K. pneumoniae</i>	0	0.75 b	1.48 cd	18.37 cd	1.80 d
SOS-10	<i>K. pneumoniae</i>	0.25	0.28 fgh	1.04 fg	17.26 de	1.22 ghi
SOS-10	<i>K. pneumoniae</i>	0.5	0.19 ij	0.48 kl	15.44 efg	1.69 def
SOS-10	AG ₃	0	0.96 a	1.58 bc	17.72 de	1.24 ghi
SOS-10	AG ₃	0.25	0.45 e	0.89 ghi	20.63 bc	1.13 i
SOS-10	AG ₃	0.5	0.45 e	0.76 ij	20.33 bc	2.78 a
Silvestre	control	0	0.35 f	1.13 ef	14.43 fgh	1.24 ghi
Silvestre	control	0.25	0.12 jk	0.39 l	5.44 I	0.71 j
Silvestre	control	0.5	0.09 k	0.02 m	0.89 j	0.13 k
Silvestre	<i>A. halopraeferens</i>	0	0.49 de	1.46 cd	18.50 cd	1.71 de
Silvestre	<i>A. halopraeferens</i>	0.25	0.23 ghi	0.66 jk	12.05 h	1.49 efg
Silvestre	<i>A. halopraeferens</i>	0.5	0.12 jk	0.31 l	15.99 defg	1.45 fgh
Silvestre	<i>K. pneumoniae</i>	0	0.68 b	1.69 b	21.33 b	2.23 b
Silvestre	<i>K. pneumoniae</i>	0.25	0.35 f	1.02 fgh	16.68 def	2.33 b
Silvestre	<i>K. pneumoniae</i>	0.5	0.23 ghi	0.81 hij	14.42 fgh	1.72 de
Silvestre	AG ₃	0	0.60 c	1.16 ef	13.84 gh	0.50 j
Silvestre	AG ₃	0.25	0.44 e	0.95 fgghi	14.14 fgh	1.38 ghi
Silvestre	AG ₃	0.5	0.16 ijk	1.29 de	17.10 de	2.18 bc

Promedios indicados con una letra denotan diferencia significativa a un nivel de $P=0.05$. Las comparaciones fueron realizadas con una Prueba de Rango Múltiple de Duncan. Los valores representan la media de cinco repeticiones.*= 1×10^8 unidades formadoras de colonias. **= 8.661×10^{-5} M

6.2.4. Efecto en la altura de las plántulas en ambos genotípos

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$). En la tabla 6.2.3 se observa que la respuesta de la variable altura, fue similar al de la raíz, donde *A. halopraeferens* muestra los valores más altos seguida de *K. pneumoniae*. Asimismo, se confirmó que esta variable disminuye conforme aumenta la salinidad a excepción del tratamiento con ácido giberélico, que actuó de manera positiva sobre esta variable.

6.2.5. Efecto en el peso fresco de ambos genotípos

El efecto de *A. halopraeferens* en el peso fresco a concentraciones de 0.0, 0.25 y 0.5 M de NaCl, mostró un efecto positivo con respecto a los demás tratamientos. Sin embargo, el ácido giberélico fue mejor a salinidades de 0.25 y 0.5M, en contraste con *K. pneumoniae* que mostró resultados opuestos; esta tendencia se había observado de manera similar en las demás variables (Tabla 6.2.3).

6.2.6. Peso seco en plántulas de genotipo mejorado SOS-10 y silvestre

Como se puede apreciar en la Tabla 6.2.3, en esta variable se observó un ligero incremento conforme aumentó la salinidad en el genotipo mejorado, en presencia de cada una de las bacterias; sin embargo, el ácido giberélico mantuvo una diferencia, estadísticamente significativa, con respecto a los demás tratamientos, siguiéndole *A. halopraeferens* y *K. pneumoniae*, respectivamente.

6.2.7. Efecto de la salinidad sobre la adhesión de *K. pneumoniae* y *A. halopraeferens* al sistema radicular de genotipo mejorado SOS-10 y silvestre

Bajo las tres concentraciones de salinidad probadas, *K. pneumoniae* y *A. halopraeferens* mostraron igualdad con $P < 0.05$, respecto a el número de células adheridas al sistema radicular entre ambos inoculantes, en el genotipo mejorado y silvestre y en cada una de las concentraciones salinas (Fig. 6.2.7.A); observándose un ligero descenso con el aumento de NaCl (Fig. 6.2.7.B).

Debido a que el cultivo de *Salicornia* está siendo mejorado para el uso en el sector agrícola (Glenn *et al.*, 1995), es importante considerar estrategias para su cultivo. Se han realizado varios experimentos sobre la germinación de *Salicornia* spp bajo condiciones salinas (Ungar, 1978; Ungar, 1982; Ungar 2000) y la utilización de hormonas tales como giberelinas (Kan, 1971; Ungar, 1982; Ungar, 2000). Los resultados del presente estudio coinciden con los mostrados anteriormente, concluyendo que la salinidad reduce el porcentaje de germinación.

También se encontró que el uso de la hormona utilizada en este estudio induce la germinación conforme aumenta la salinidad, pero con valores debajo de los obtenidos en tratamientos sin salinidad. Lo anterior pudo observarse debido a que cuando se inoculó *Klebsiella pneumoniae* durante la etapa de germinación, usando *Azospirillum halopraeferens* y el regulador de planta ácido giberélico (AG₃) como controles, se obtuvieron resultados con diferencias entre tratamientos (Fig. 6.2.1. A-B y Tabla 6.2.3). De la misma manera, se observó que cuando la salinidad se incrementa, la inhibición de germinación es mayor para ambos

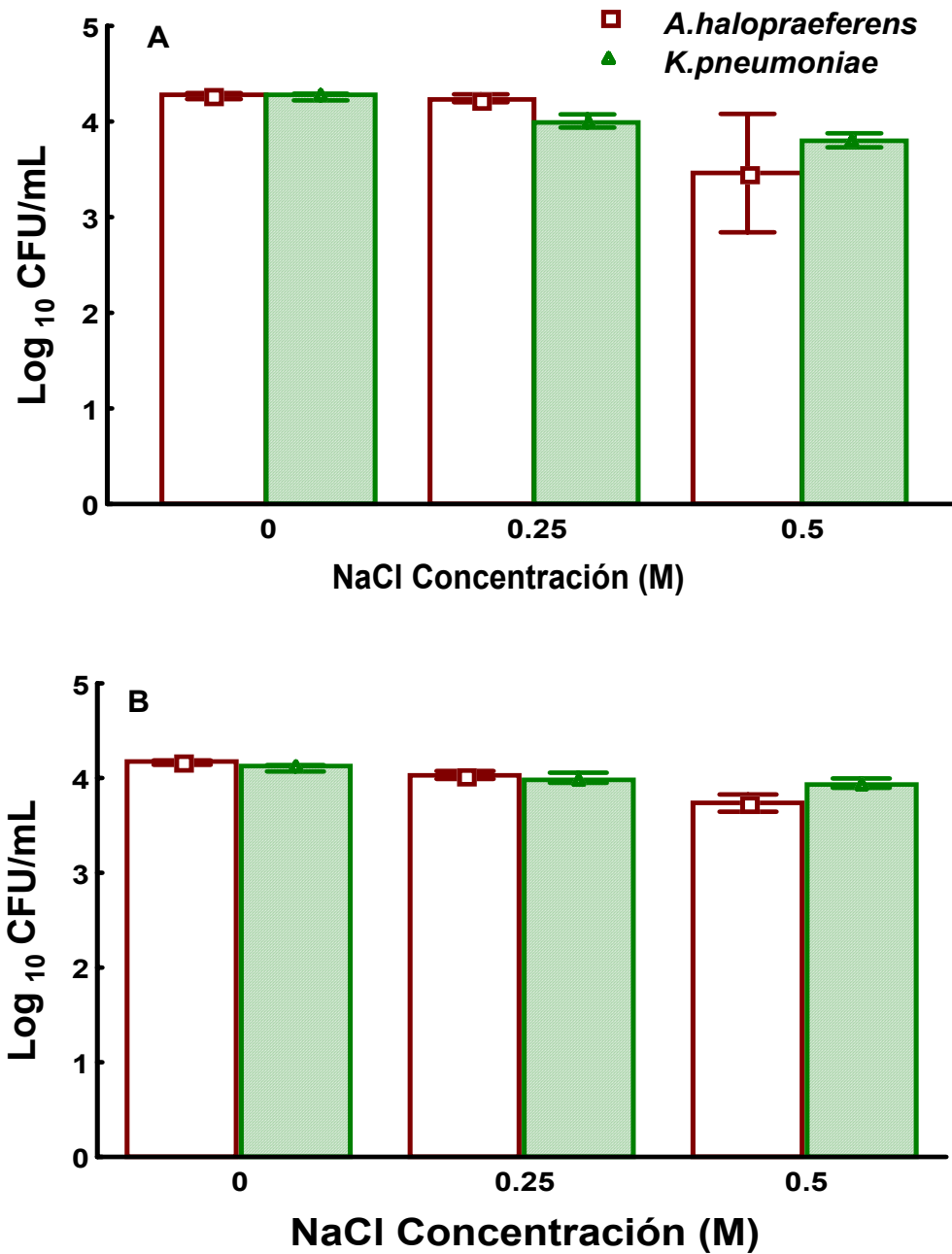


Fig. 6.2.7. Unidades formadoras de colonias (UFC/mL) de *K. pneumoniae* y *A. halopraeferens* bajo tres concentraciones de NaCl (0, 0.25, 0.5 M) adheridas al sistema radicular de dos genotipos de *S. bigelovii* ((A) SOS-10 y (B) Silvestre). Las barras representan el error estandar de las medias.

genotipos.

Las semillas inoculadas con *Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens* germinaron por arriba de un 20% más frecuente en el tratamiento de 0 M NaCl.

Por otra parte, también se observó que la salinidad repercutió ligeramente con una disminución de unidades formadoras de colonias adheridas al sistema radicular. Sin embargo, la interacción de bacterias con ambos genotipos mostró que *A. halopraeferens* (UFC) no fue menos afectado cuando se inoculó al genotipo mejorado (SOS-10) como cuando se inoculó al genotipo silvestre, mientras que la bacteria *K. pneumoniae* mostró lo contrario. Esta especificidad de asociación planta-bacteria hasta la fecha es discutible de acuerdo con hallazgos publicados por Arsac *et al.*, (1990), Baldani y Dobereiner (1980) quienes indican que este tipo de resultados puede depender de la especificidad de la planta así como también del tipo de especie de microorganismo.

El presente estudio indica que ambos genotipos son beneficiados por *K. pneumoniae* y *A. halopraeferens*. Resultados similares se han obtenido para otras plantas (Puente *et al.*, 1999; Rozema *et al.*, 1975; Goodfriend *et al.*, 2000) y que, aunque los ensayos se hayan efectuado con otras plantas y otros microorganismos benéficos, algunos inhiben los efectos sobre la germinación (Díaz *et al.*, 2001). Sin embargo, otros estudios muestran efectos positivos con este tipo de microorganismo (Arsac *et al.*, 1990; Puente y Basham, 1993) que también coinciden con los resultados del presente estudio. Los efectos positivos de estas bacterias observados en el presente estudio aparentemente se deben a la producción de sustancias promotoras de crecimiento según lo reportado en otros estudios (Arsac, *et al.*, 1990; Haahtela, *et al.*, 1990; Turyanitsa *et al.*, 1995; El -Khawas y Adachi, 1999).

6.3. EFECTO DE LA BACTERIA *Klebsiella pneumoniae* EN EL DESARROLLO INICIAL DE *Salicornia bigelovii*

La Tabla 6.3.A, muestra los efectos observados un mes después de la inoculación de las bacterias, debido a los dos tipos de inoculación de las bacterias, sobre el crecimiento de *S. bigelovii* (altura y longitud radicular), donde *K. pneumoniae* utilizando la forma líquida y en esferas interaccionó positivamente en la altura de *S. bigelovii* (37% y 75%, respectivamente) en comparación con el control sin inoculante. Así mismo, al ser coinoculada con *A. halopraeferens*, el crecimiento se incrementó hasta en un 80% en forma líquida y un 87% en forma de esferas (comparado con el control sin inoculante). Sin embargo, el tratamiento correspondiente con la bacteria *A. halopraeferens*, utilizando la vía de esferas incrementó el crecimiento de la planta un 42% por arriba de *K. pneumoniae* inoculada en forma de esferas. En longitud de raíz ambos inoculantes en los dos tipos de inoculación (a excepción de *K. pneumoniae* en líquida) favorecieron positivamente la longitud radicular en comparación del control sin inoculante. Sin embargo, no hubo diferencia significativa entre tratamientos (Tabla 6.3.A).

Por otra parte, al contabilizar el número de células bacterianas adheridas a la raíz de *Salicornia*, se observó diferencias insignificativas entre tipos de inoculación (líquida y esferas), sin embargo, se pudo observar que numéricamente los tratamientos coinoculados muestran valores más altos (Tabla 6.3.B).

Tabla 6.3.A. Promedios de las variables longitud de plántula y longitud radicular, con respecto a las bacterias *Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens* (control biológico) y los dos tipos de inoculación (líquida y esferas) un mes después de la inoculación.

Tratamiento	Tipo de inoculación	Altura mm	Raíz mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	líquida	3.66 d	2.93 b
<i>Azospirillum halopraeferens</i>	líquida	4.58 b	3.70 a
<i>K. pneumoniae</i> + <i>A. halopraeferens</i>	líquida	4.80 b	3.73 a
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	esferas	4.66 b	3.71 a
<i>Azospirillum halopraeferens</i>	esferas	6.16 a	3.65 a
<i>K.pneumoniae</i> + <i>A.halopraeferens</i>	+ esferas	5.00 b	3.48 a
Esferas de alginato	esferas	3.83 cd	3.58 a
Control	sin inocular	2.66 e	3.10 b

Valores seguidos por letra diferente en cada columna son diferentes ($p=0.05$).

Tabla 6.3.B. Unidades formadoras de colonias (UFC/mL) adheridas al sistema radicular de *S. bigelovii* SOS-10.

Tratamiento	Tipo de inoculación	Log ₁₀ UFC/mL
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	líquida	3.99 bc
<i>Azospirillum halopraeferens</i>	líquida	4.11 a
<i>K. pneumoniae</i> + <i>A. halopraeferens</i>	líquida	4.13 a
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	esferas	3.91 c
<i>Azospirillum halopraeferens</i>	esferas	4.06 b
<i>K.pneumoniae</i> + <i>A. halopraeferens</i>	+ esferas	4.10 ab
Esferas de alginato	esferas	ND
Control	sin inocular	ND

Valores seguidos por letra diferente en cada columna son diferentes ($p=0.05$).

ND =no determinado.

6.4. EVALUACIÓN DE LAS VARIABLES DE CRECIMIENTO, DESARROLLO Y DE LA PRODUCCIÓN DE *Salicornia bigelovii* CON LA INOCULACIÓN DE *Klebsiella pneumoniae* BAJO CONDICIONES DE CAMPO

6.4.1. Germinación

Los resultados obtenidos en la tasa de germinación (Fig. 6.4.1), indican que se destacan las plántulas inoculadas con las bacterias benéficas de *K. pneumoniae* y *A. halopraeferens*. Sin embargo, aún cuando el comportamiento de germinación haya resultado ser mejor en los genotipos inoculados, en el porcentaje final de germinación no se observó una diferencia estadística significativa (Fig. 6.4.1). Se observó también que el genotipo silvestre sin inoculación presentó los valores inferiores del porcentaje de germinación.

Los resultados anteriores indican que ambas bacterias promueven la germinación en los dos los genotipos del estudio, SOS-10 y el silvestre (Fig. 6.4.1), posiblemente debido a la capacidad de las bacterias para producir y estimular la síntesis de compuestos hormonales como las giberelinas GA₃, que son mencionadas por otros autores (Tien *et al.*, 1979; Reinhold *et al.*, 1987; Haahtela *et al.*, 1990; Kozyrovskaya *et al.*, 1990; Conrad *et al.*, 1992; Rodelas *et al.*, 1996; Zexun and Wei 2000). Los resultados obtenidos sugieren que la especie de *Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens* pueden influir en las plantas, por lo que es importante continuar con la búsqueda de este tipo de microorganismos; asimismo, los datos sugieren que se exploren las posibilidades para continuar los estudios de inoculación con otras

familias y/o grupos de plantas halófitas que puedan tener fines comerciales. Las consideraciones anteriores son importantes, porque el éxito de este tipo poblaciones halotolerantes usualmente sólo tienen una oportunidad en su historia de vida anual para reproducirse y dispersarse, eventos que son dependientes de las respuestas mostradas durante la germinación de semillas (Ungar 1977). Tal es el caso de la germinación de *S. bigelovii*, que ocurre durante un período cuando en el suelo, los niveles de salinidad se encuentran reducidos (Riehl y Ungar 1982; Rozema 1975). De igual modo, los resultados obtenidos indican que los efectos benéficos de los microorganismos pueden tener un papel principal en las diferentes fases vegetativas, como es el proceso de la germinación (Kim y Weber 1985; Ellen y Cuuningham 1983; Booth *et al.*, 1998; Hildebrandt *et al.*, 2000; Goodfriend *et al.*, 2000; Bagwell *et al.*, 2001). Sin embargo, cabe indicar que los efectos observados de manera positiva deben evaluarse en el entorno de la aplicación práctica, como en el caso del desarrollo o propuesta de un programa agrícola costero (Hamdi 1999; Neori y Zskova-KonZcalova 2001).

Datos de origen:

Tratamiento	Valores con $P < 0.05$	Tratamiento	Valores con $P < 0.05$	Tratamiento	Valores con $P < 0.05$
Semilla silvestre	73% c	Silvestre + <i>K.pneumoniae</i>	89% a	SOS-10 + <i>A. halopraeferens</i>	89% a
Semilla Silvestre + <i>A. halopraeferens</i>	88% a	Semilla SOS-10	86% a	SOS-10 + <i>K.pneumoniae</i>	81% b

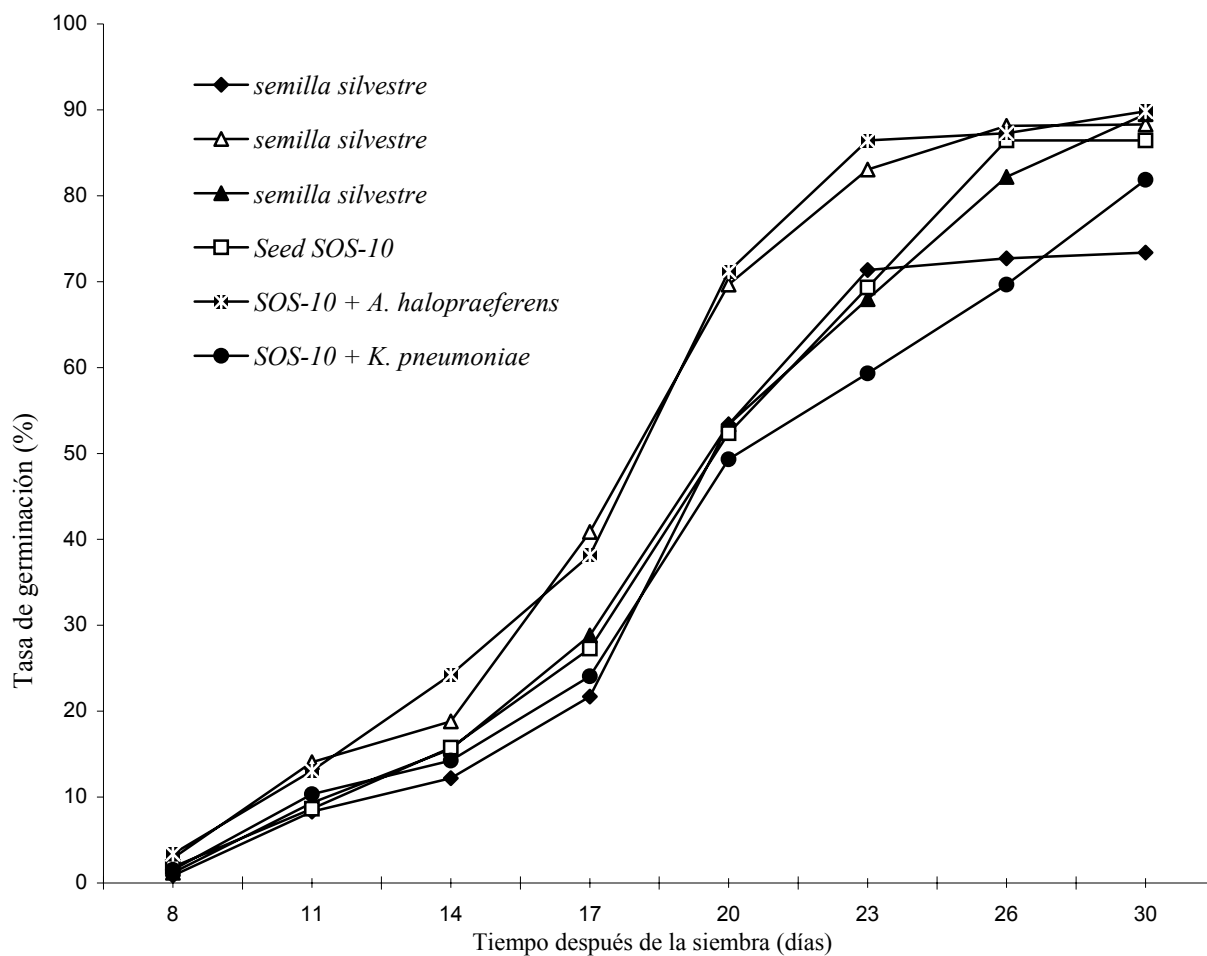


Fig. 6.4.1. Influencia de *Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens* en la tasa de germinación (numero de semillas por día) de dos genotipos de *Salicornia bigelovii* (SOS-10 y silvestre) bajo condiciones de campo.

6.4.2. Etapa de desarrollo vegetativo

Durante el desarrollo vegetativo se observó, que el tratamiento con *K. pneumoniae* no interaccionó con $P < 0.05$, en el crecimiento de *S. bigelovii* (ambos genotipos). Sin embargo, *A. halopraeferens* indujo una altura mayor de planta con respecto a los demás tratamientos, específicamente, en las etapas de floración y al final del ciclo vegetativo (Fig. 6.4.2).

Cabe mencionar que durante las primeras etapas de crecimiento vegetativo las plantas de los tratamientos no inoculados mostraron mayor susceptibilidad a las condiciones ambientales durante su fase de desarrollo (Fig. 6.4.2).

6.4.3. Floración, peso fresco, peso seco, longitud radicular y contenido de nitratos (NO₃) en la etapa fisiológica de floración

En la Fig. 6.4.3.A se muestran los datos obtenidos con respecto al porcentaje de floración alcanzado por las plantas expuestas a los tratamientos.

Los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$). Aunque *A. halopraeferens* estimuló un porcentaje mayor de floración en el genotipo SOS-10 con $P < 0.05$ (Fig.6.4.3.A), se observó que *K. pneumoniae* numéricamente interaccionó positivamente en comparación con los controles sin inocular de ambos genotipos.

Datos de origen:

Tratamiento	Valores con $P < 0.05$	Tratamiento	Valores con $P < 0.05$	Tratamiento	Valores con $P < 0.05$
Semilla silvestre	34.3 b	Semilla silvestre + <i>K.pneumoniae</i>	34.5 b	SOS-10 + <i>A. halopraeferens</i>	45.3 a
Semilla silvestre + <i>A. halopraeferens</i>	34.4 b	Semilla SOS-10	34.3 b	SOS-10 + <i>K.pneumoniae</i>	35.6 b

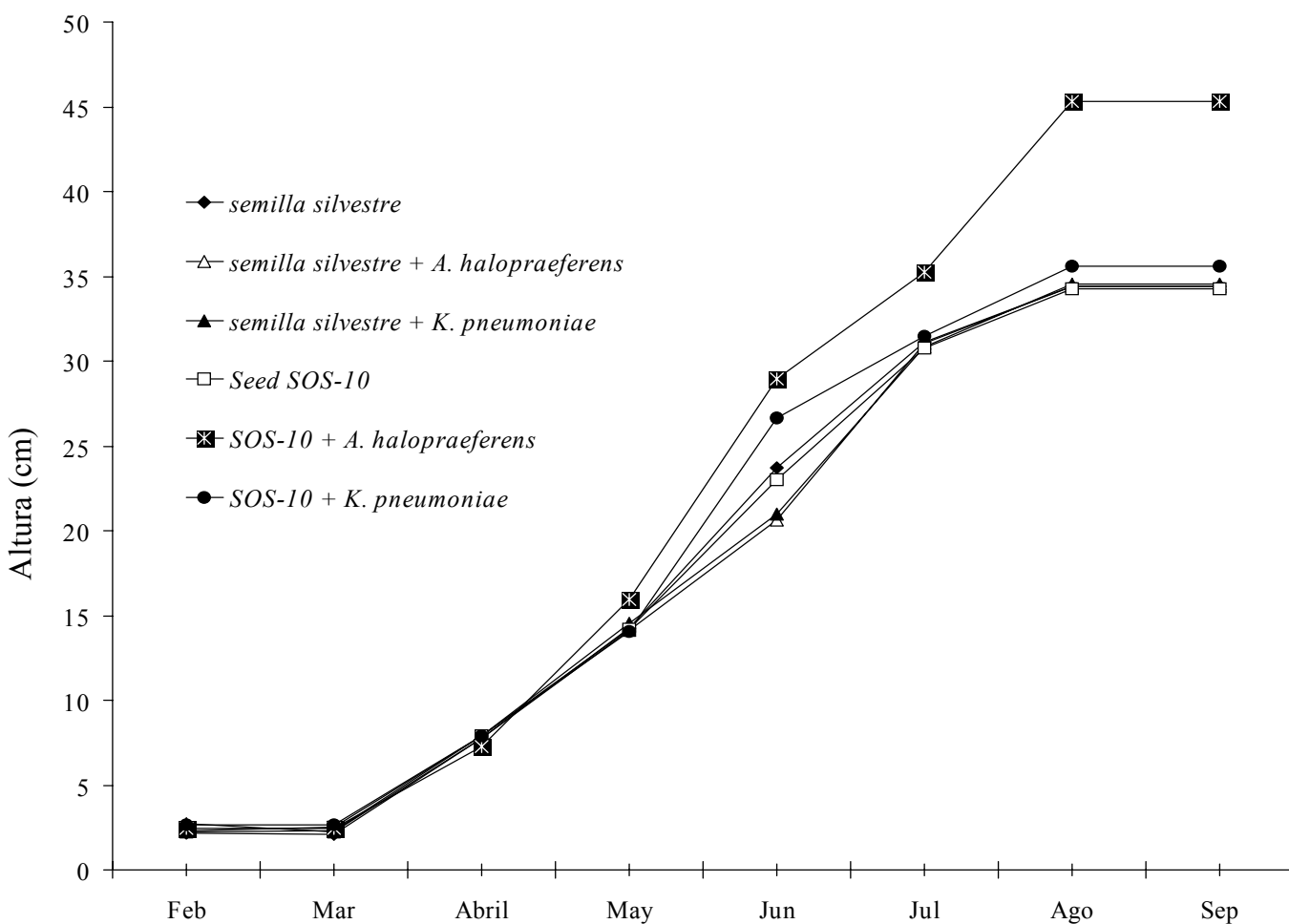


Fig. 6.4.2. Dinámica de crecimiento de dos genotipos de *Salicornia bigelovii* (SOS-10 y silvestre) por la influencia de *Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens* bajo condiciones de campo.

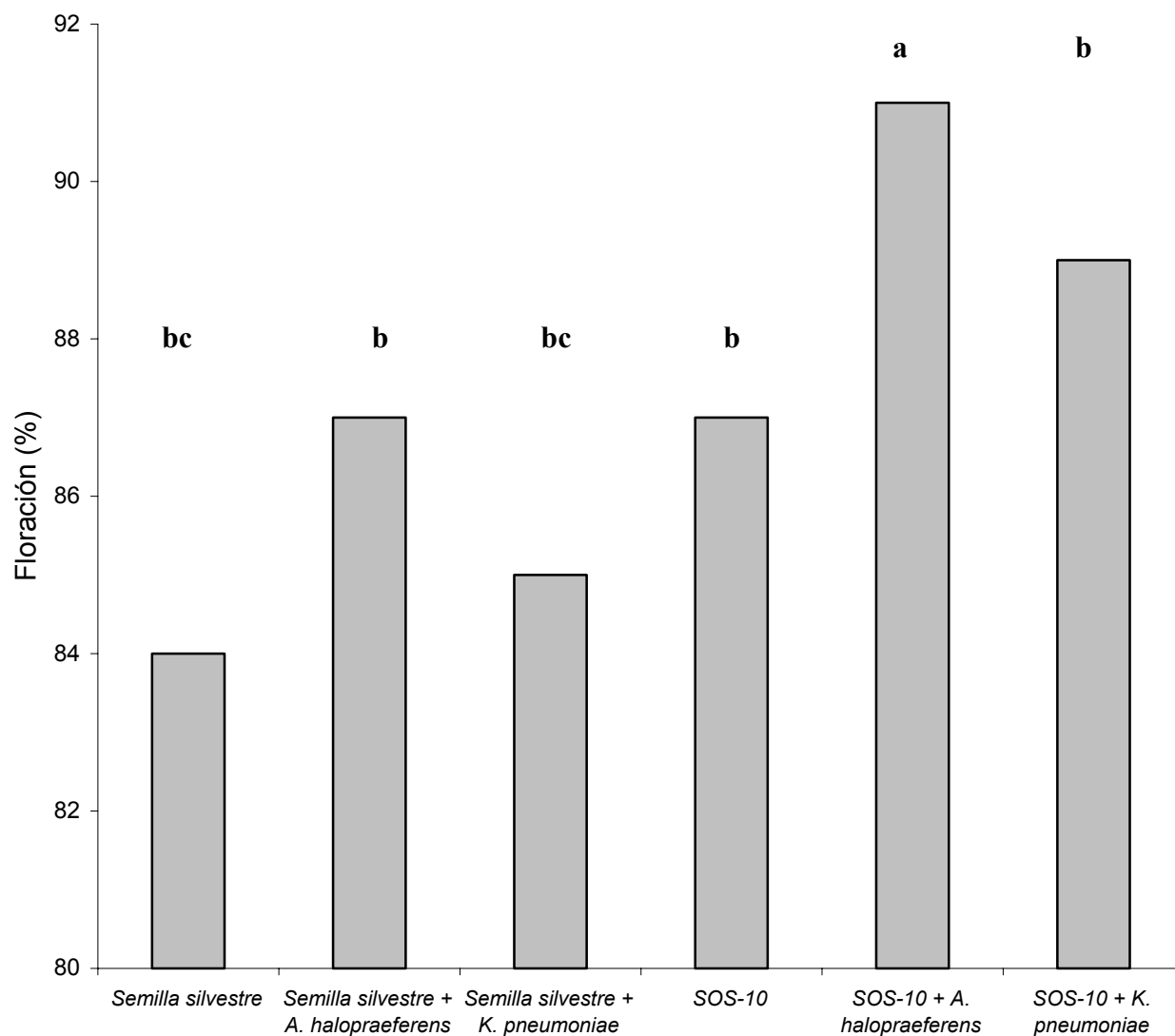


Fig. 6.4.3.A. Porcentaje final de floración en dos genotipos de *Salicornia bigelovii* (SOS-10 y Silvestre) por el efecto de bacterias fijadoras de N₂ (*Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens*) bajo condiciones de campo.

Con respecto al peso fresco de muestras obtenidas en la etapa de floración, los resultados mostraron diferencias significativas ($P<0.05$) entre los tratamientos bajo condiciones de campo. El genotipo silvestre inoculado con *K. pneumoniae* estimuló en un 200% mientras que con *A. halopraeferens* el efecto fue en un 94% (Fig. 6.4.3.B). Sin embargo, el genotipo mejorado inoculado con *A. halopraeferens* y *K. pneumoniae* fue estimulado en un 900% y 150%, respectivamente.

En cuanto al peso seco alcanzado en la etapa de floración, los resultados muestran que ambos genotipos fueron estimulado por los inoculantes, mostrando los más altos valores *A. halopraeferens* para ambos genotipos (Fig. 6.4.3.B).

En relación con la longitud radicular, al realizar los análisis de varianza se observaron diferencias significativas entre tratamientos, donde el crecimiento mayor lo mostró el genotipo mejorado inoculado con el control biológico *A. halopraeferens*, siguiendole en segundo plano el genotipo silvestre con *K. pneumoniae* (Fig. 6.4.3.C).

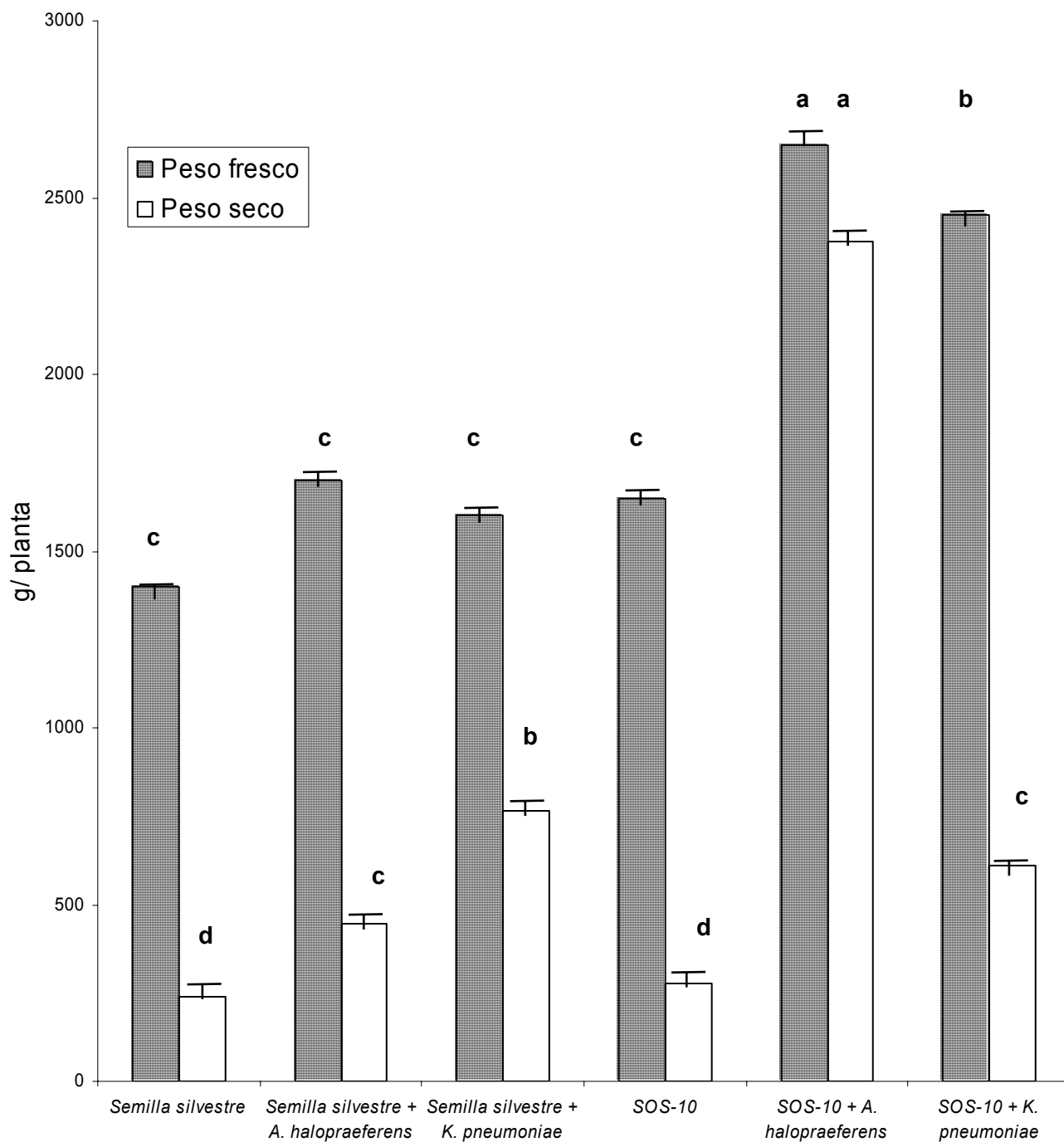


Fig. 6.4.3.B. Efecto de bacterias fijadoras de N_2 (*Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens*) bajo condiciones de campo, en el peso seco y fresco de plantas en etapa de floración en dos genotipos de *Salicornia bigelovii* (SOS-10 y Silvestre). Las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

El contenido de nitratos en las plantas control de ambos genotipos fueron muy altos respecto a las plantas que no fueron inoculadas con las bacterias fijadoras de N_2 empleadas en este estudio. Esta aparente inhibición en la toma o acumulación de nitratos parecieran ser controversiales, sin embargo cabe indicar que se trata de NO_3 y no de nitrógeno total (Fig. 6.4.3.D). Resultados similares se han encontrado en estudios de plantas de maíz (*Zea mays*) (Pérez-Silva 1989; Blackmer y Scheppers 1995), donde se aplicaron diferentes niveles de fertilizantes a partir de N_2 , las concentraciones bajas de NO_3 detectadas en la savia estaban siendo dirigidas hacia la formación de biomasa.

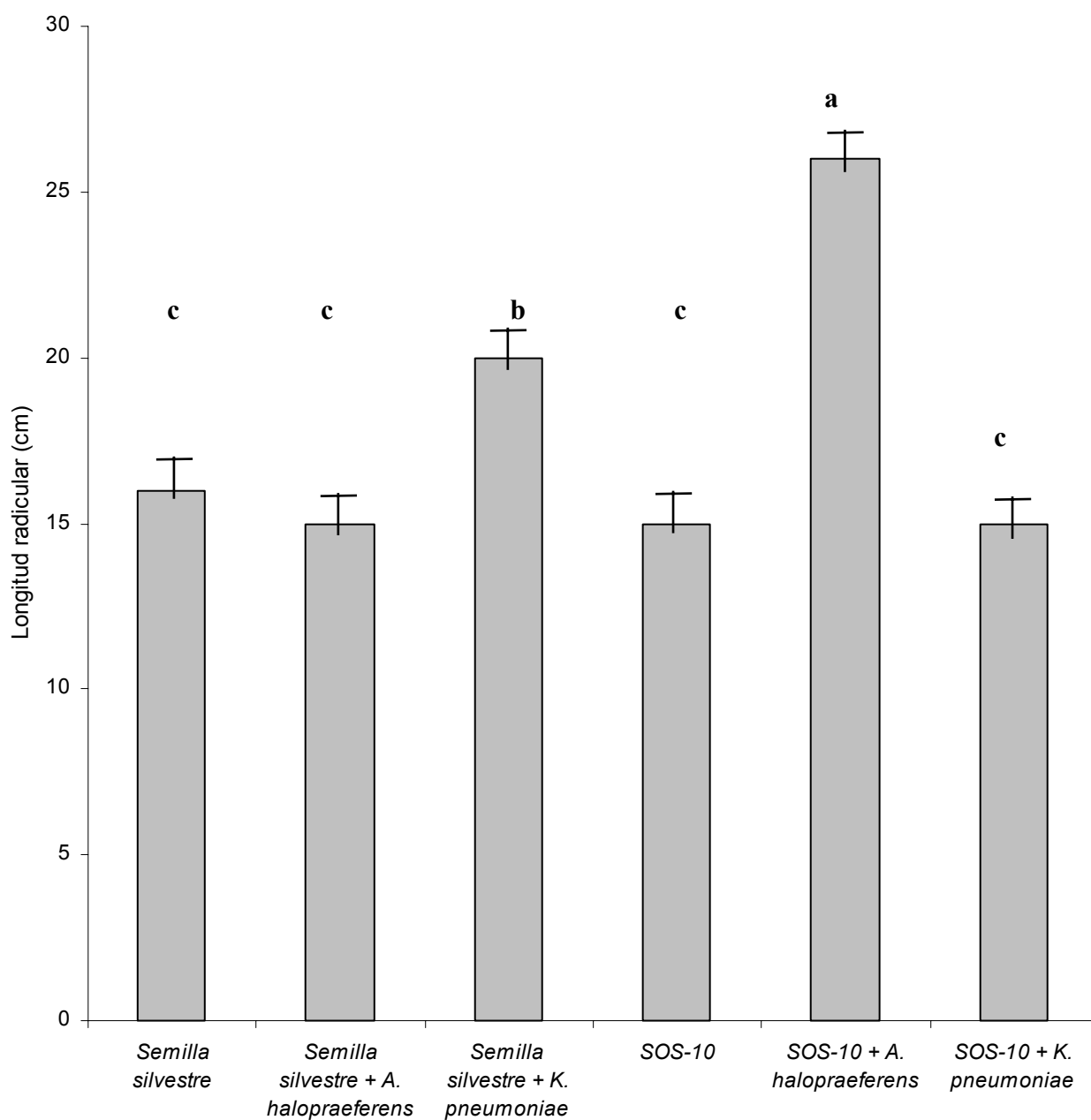


Fig. 6.4.3.C. Efecto de bacterias fijadoras de N_2 (*Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens*) en la longitud radicular de dos genotipos de *Salicornia bigelovii* en la etapa de floración y bajo condiciones de campo.

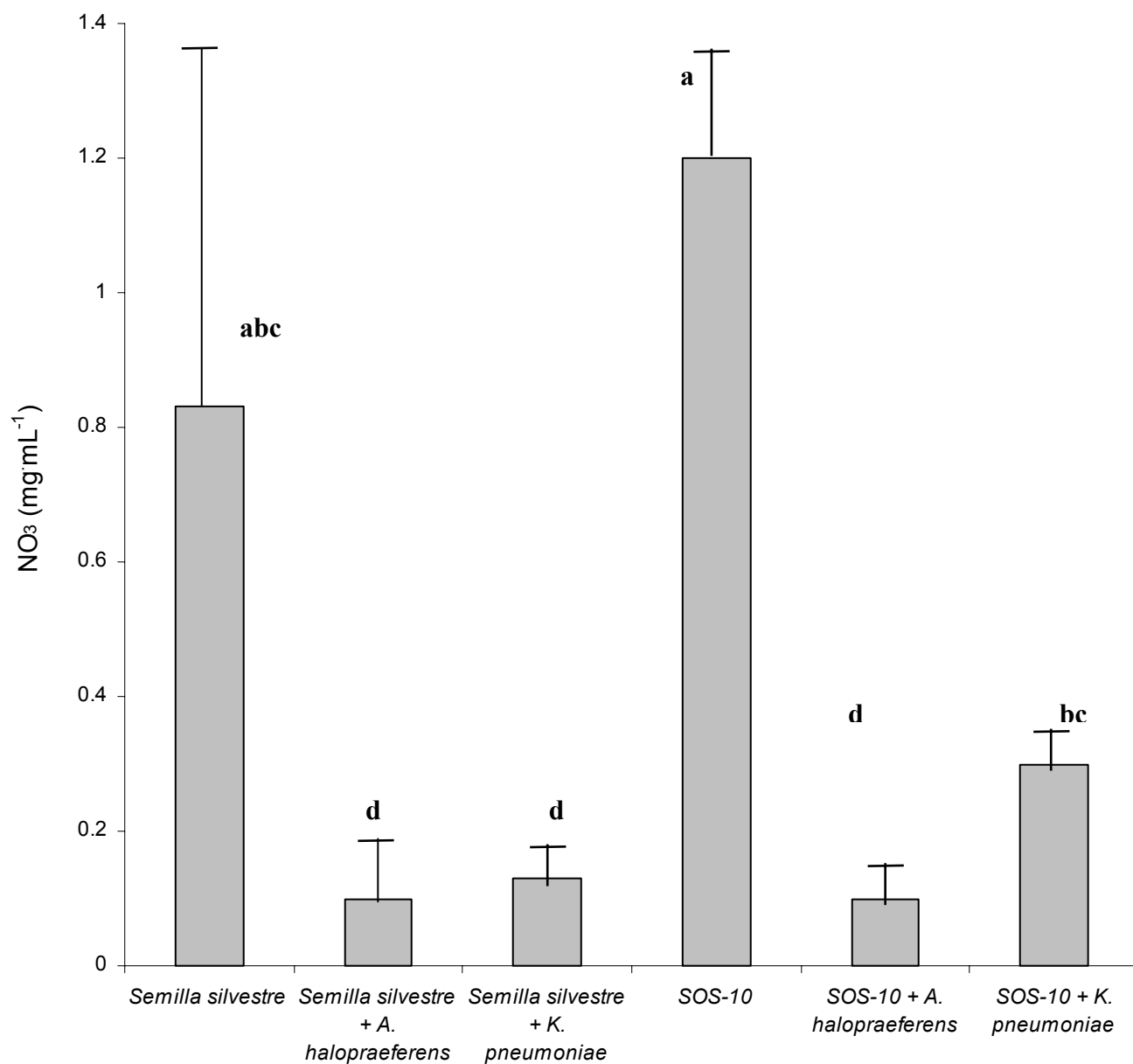


Fig. 6.4.3.D. Efecto de bacterias fijadoras de N₂ (*Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens*) en el contenido de NO₃/mL en savia de dos genotipos de *Salicornia bigelovii* en la etapa de floración y bajo condiciones de campo.

6.4.4. Proporciones de lípidos, proteínas y cenizas de tres partes vegetativas (raíz, tallo, parte aérea) en floración

Sobre las proporciones de lípidos en la raíz, los resultados indican que los efectos de las bacterias fijadoras de N₂ en ambos genotipos muestran los valores más altos con relación a los controles (no inoculados). Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.5$) entre tratamientos (Tabla 6.4.4). Se observó la misma tendencia en tallo y la parte aérea de la planta. En cuanto a los efectos en la concentración de proteínas totales, los resultados indicaron diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$) en cada órgano (raíz, tallo y parte aérea), donde el genotipo SOS-10 inoculado con *A. halopraeferens* mostró los valores más altos (Tabla 6.4.4). De la misma manera, para la variable cenizas, aún cuando sólo se haya realizado en órganos de tallo y parte aérea, los análisis estadísticos mostraron resultados similares a los de proteínas, donde el genotipo mejorado (SOS-10) inoculado con *A. halopraeferens* presentó los valores más altos, seguido del tratamiento silvestre + *K. pneumoniae*. Los genotipos no inoculados presentaron los valores inferiores (Tabla 6.4.4).

Tabla 6.4.4. Efecto de bacterias fijadoras de N₂ (*Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens*), en el contenido de lípidos, proteínas y cenizas de tres partes vegetativas (raíz, tallo y parte aérea) en etapa de floración de dos genotipos de *Salicornia bigelovii* (SOS-10 y Silvestre) bajo condiciones de campo.

Genotipo	Inoculante [Bacteria]	Raíz		Tallo			Porción aérea		
		Lípidos	Proteína	Lípidos	Proteína	Cenizas	Lípidos	Proteína	Cenizas
silvestre	<i>K. pneumoniae</i>	94.6 b	5.55 b	26.69 a	9.76 a	41.47 b	27.04 b	9.38 b	59.18 b
silvestre	<i>A.</i>	95.4 b	4.79 d	17.50 d	7.57 c	42.56 b	22.54 e	6.23 e	58.16 c
	<i>halopraeferens</i>								
silvestre	Control	52.0 e	4.09 f	14.22 f	5.38 e	38.10 c	21.94 f	7.08 d	56.60 d
SOS-10	<i>K. pneumoniae</i>	89.4 c	5.23 c	24.33 b	8.87 b	40.47 cb	26.52 c	9.47 b	58.88 b
SOS-10	<i>A.</i>	98.1 a	5.77 a	23.64 c	9.75 a	45.27 a	28.71 a	10.74 a	59.84 a
	<i>halopraeferens</i>								
SOS-10	Control	76.2 d	4.40 e	15.18 e	6.47 d	39.93 c	22.98 d	7.73 c	55.71 e

Nota: Promedios con misma literal en columna indican que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$).

Los resultados anteriores muestran que el crecimiento de *S. bigelovii* durante el desarrollo vegetativo, fue promovido por las bacterias benéficas y que por lo tanto su uso puede ayudar en la expresión de su potencial de crecimiento y desarrollo, e.g. una mayor producción de biomasa. Es importante indicar que entre los mecanismos de interacción que citan algunos autores sobre microorganismos benéficos y plantas, es el de la promoción del crecimiento y desarrollo inducido por sustancias reguladoras de crecimiento (Itai y Vaadia 1968; Mizrahi *et al.*, 1970; Ungar 1978 (b); O'Leary y Prisco 1970; Khan *et al.*, 1976), fijación de N₂ y asimilación como nitrógeno orgánico, una captación mineral reforzada y un crecimiento mejorado de la raíz (Baldani y Dobereiner 1980; Albrecht *et al.*, 1981; Haahtela *et al.*, 1990; Kozyrovskaya *et al.*, 1990; Conrad *et al.*, 1992; Rodelas *et al.*, 1996; Chelius y Triplett 2000; Zexun y Wei 2000; El-Shatnawi *et al.*, 2001).

6.4.5. Efecto de *Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens* en el rendimiento de *Salicornia bigelovii* (SOS-10 y silvestre)

Los resultados muestran que la inoculación de los genotipos con *K. pneumoniae* y *A. halopraeferens* afectó significativamente de manera positiva la producción de semilla (Tabla 6.4.5). Referente a la producción de biomasa (g m^{-2}), los resultados fueron similares en el genotipo mejorado con ambos inoculantes fijadores de N_2 , mostrando valores numéricamente altos en comparación con los demás. Los valores inferiores fueron para los dos genotipos no inoculados y utilizados como controles (Fig. 6.4.5).

Tabla 6.4.5. Efecto de bacterias fijadoras de N_2 (*Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens*) sobre las variables producción de semilla (g planta^{-1} , g m^{-2} y kg ha^{-1}) de dos genotipos de *Salicornia bigelovii* (SOS-10 y Silvestre) bajo condiciones de campo.

Genotipo	Inoculante (Bacteria)	Producción de semilla		
		g planta^{-1}	g m^{-2}	kg ha^{-1}
Silvestre	<i>K. pneumoniae</i>	1.30 a	64.9 a	649.0 a
Silvestre	<i>A. halopraeferens</i>	1.18 b	58.9 b	589.9 b
Silvestre	Control	0.27 c	13.5 c	135.8 c
SOS-10	<i>K. pneumoniae</i>	1.30 a	64.8 a	648.0 a
SOS-10	<i>A. halopraeferens</i>	1.38 a	68.9 a	689.0 a
SOS-10	Control	0.33 c	16.3 c	163.4 c

Nota: Promedios con misma literal en columna indican que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$).

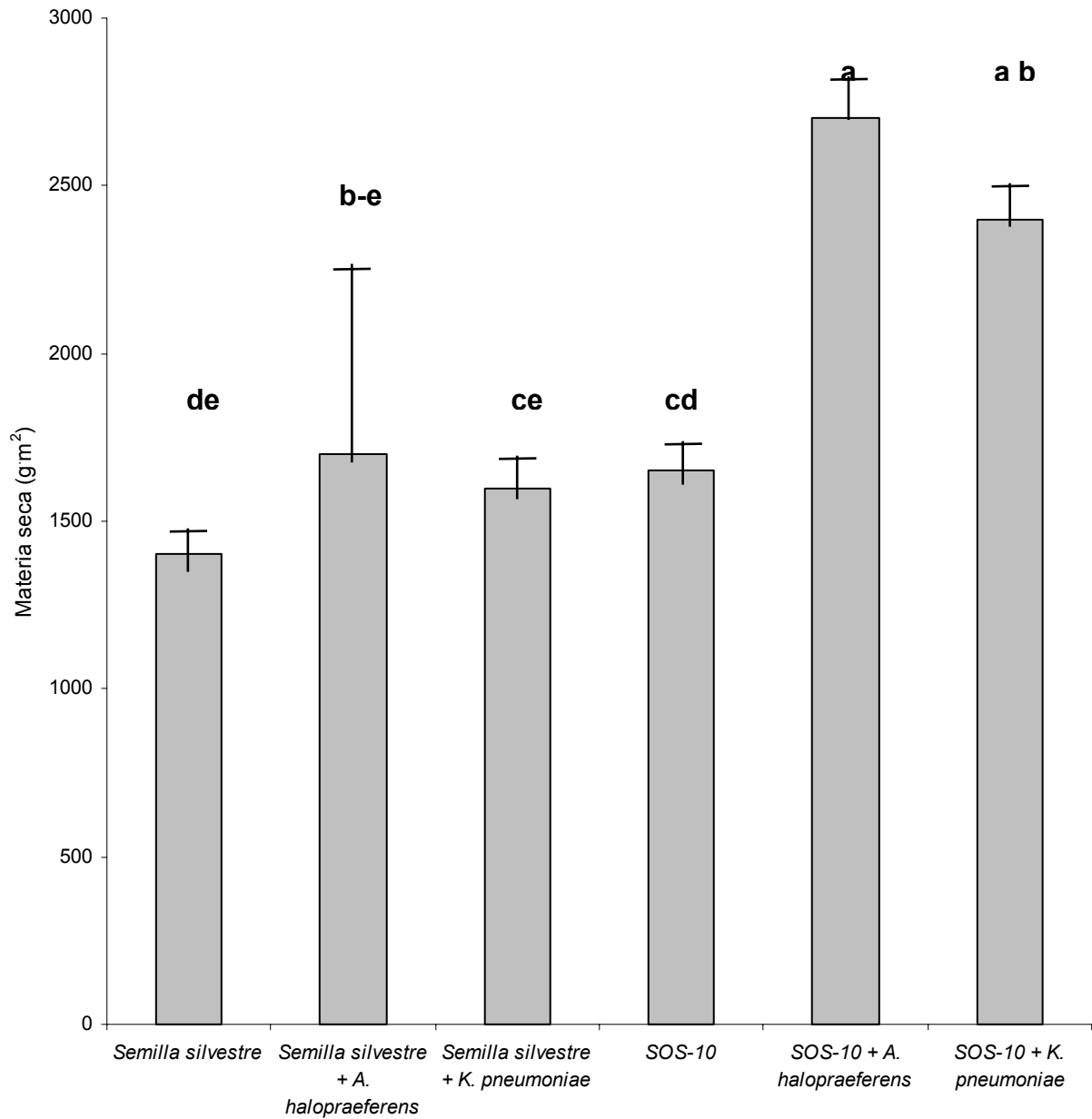


Fig. 6.4.5. Efecto de bacterias fijadoras de N₂ (*Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens*) en la producción de biomasa (materia seca g m⁻²) obtenida de dos genotipos de *Salicornia bigelovii* (SOS-10 y Silvestre) bajo condiciones de campo.

9.4.6. Proporciones de lípidos, proteínas y cenizas en semilla

Los análisis de varianza mostraron diferencias significativas para la proporción de lípidos, proteínas, humedad y cenizas. Se encontró que las plantas inoculadas con las bacterias fijadoras de N₂ (Tabla 6.4.6.A) mostraron valores superiores en comparación con las plantas de los tratamientos controles. Los valores superiores de lípidos se obtuvieron en forma consecutiva mostrando una igualdad estadística para los tratamientos Silvestre + *K. pneumoniae*, SOS-10 + *K. pneumoniae*, SOS-10 + *A. halopraeferens*, y Silvestre + *A. halopraeferens*. Para proteínas, SOS-10 + *A. halopraeferens* mostró valores superiores, seguido de el mismo genotipo mejorado pero inoculado con *K. pneumoniae*. Para la variable humedad y cenizas, el genotipo SOS-10 inoculado con *K. pneumoniae* fue estadísticamente superior con relación al resto de los tratamientos.

Referente a las proporciones de ácidos grasos, los análisis estadísticos indican que hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) entre tratamientos con el contenido de ácido graso palmítico, resultando ser el tratamiento inoculado con *K. pneumoniae* en genotipo silvestre entre los valores más altos, mientras que el genotipo SOS-10 + *A. halopraeferens*, resultó el más afectado con este ácido. Referente al ácido esteárico no hubo igualdad estadística entre tratamientos inoculados en ambos tipos de semilla; respecto al oleico *K. pneumoniae* + SOS-10 resultó ser significativamente alto en comparación de los demás tratamientos. Con el ácido linoleico el genotipo SOS-10 + *A. halopraeferens* resultó estadísticamente significativo siguiéndole en segundo orden ambos genotipos inoculados con *K. pneumoniae*. Con relación al linolénico entre tratamientos no hubo significancia con

Tabla 6.4.6.A. Efecto de bacterias fijadoras de N₂ (*Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens*) en el contenido de lípidos, proteínas, humedad y cenizas presente en semilla de dos genotipos de *Salicornia bigelovii* (SOS-10 y Silvestre) bajo condiciones de campo.

Genotipo	Inoculante (Bacteria)	Semilla			
		Lípidos (mg/ g)	*Proteínas (%)	Humedad (%)	*Ceniza (%)
silvestre	<i>K. pneumoniae</i>	94.6 a	21.6 e	4.74 c	24.5 b
silvestre	<i>A. halopraeferens</i>	95.4 a	22.03 d	4.72 c	21.6 c
silvestre	control	52.0 c	22.5 c	4.63 c	20.1 d
SOS-10	<i>K. pneumoniae</i>	89.4 a	23.1 b	6.43 a	25.4 a
SOS-10	<i>A. halopraeferens</i>	98.1 a	29.0 a	5.80 b	16.3 e
SOS-10	control	76.2 b	19.3 f	4.75 c	14.1 f

Nota: Promedios con misma literal en columna indican que no existen diferencias significativas ($P>0.05$).

*Resultados expresados en base seca.

Tabla 6.4.6.B. Efecto de bacterias fijadoras de N₂ (*Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens*) en el porcentaje (% absoluto) de ácidos grasos (palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linoléico) en semilla producida en dos genotipos de *Salicornia bigelovii* (SOS-10 y Silvestre) bajo condiciones de campo.

Genotipo	Inoculante Bacteria	Acidos grasos (%)				
		Palmitico	Estearico	Oleico	Linoleico	Linolenico
silvestre	<i>K. pneumoniae</i>	15.46 ab	1.13 b	15.46 bc	65.69 b	2.26 ab
silvestre	<i>A. halopraeferens</i>	9.76 c	0.41 c	13.28 c	74.01 a	2.54 a
silvestre	control	15.46 ab	0.66 c	18.34 ab	63.00 bc	2.54 a
SOS-10	<i>K. pneumoniae</i>	11.20 bc	0.54 c	20.57 a	65.35 b	2.33 ab
SOS-10	<i>A. halopraeferens</i>	16.80 a	0.59 c	13.18 c	67.10 b	2.33 ab
SOS-10	control	17.87 a	2.38 a	15.30 bc	62.96 bc	1.49 c

excepción del genotipo mejorado sin inoculante quien resultó con los valores mas bajos (Tabla 6.4.6.B).

En cuanto a los efectos de los inoculantes bacterianos fijadores de N₂ en el periodo de vida de *S. bigelovii*, en comparación Análisis de varianza, transformando los datos de porcentaje de germinación mediante arcoseno, en la Tabla 6.4.6.C se muestra que el tiempo de vida para cada genotipo con su respectivo inoculante (bacteria) fueron estadísticamente iguales (Duncan $P < 0.05$). La Figura 6.4.6 esquematiza (de manera general) el efecto de las bacterias fijadoras de nitrógeno (*K. pneumoniae* y *A. halopraeferens*) sobre la fenología de *S. bigelovii* en sus principales etapas vegetativas.

Tabla 6.4.6.C. Efecto de bacterias fijadoras de N₂ (*Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens*) en el periodo de vida (días) de dos genotipos de *Salicornia bigelovii* (SOS-10 y Silvestre) bajo condiciones de campo.

Genotipo	Inoculante (Bacteria)	Tiempo de vida (días)	
silvestre	<i>K. pneumoniae</i>	254	ab
silvestre	<i>A. halopraeferens</i>	251	ab
silvestre	control	234	a
SOS-10	<i>K. pneumoniae</i>	272	a
SOS-10	<i>A. halopraeferens</i>	251	ab
SOS-10	control	238	a

Nota: Promedios con misma literal indican que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$).

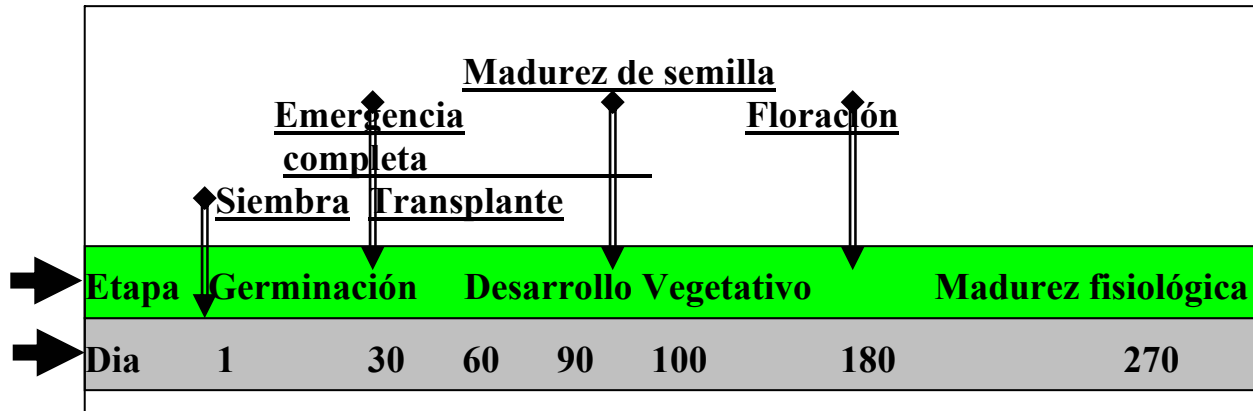


Fig. 6.4.6. Esquema del efecto de las bacterias fijadoras de N_2 (*Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens*) en las principales etapas fenológicas de *Salicornia bigelovii* bajo condiciones de campo.

7. DISCUSIÓN GENERAL

Debido a factores adversos (bióticos y abióticos) a los que están expuestos los cultivos convencionales en las zonas áridas, las halófitas con potencial productivo son los recursos biológicos más promisorios (Gallawa, 1996; Lieth y Masoom, 1993). *Salicornia bigelovii*, una halófitas que se desarrolla en las costas de Baja California Sur, se vislumbra para el futuro inmediato como una opción para contribuir en la economía agrícola con un posible impacto positivo en el desarrollo regional del sector agrícola de la Paz, B.C.S. (Mota, 1980; Gallawa, 1996). Aunado a lo anterior, los microorganismos con efecto benéfico en las plantas, juegan un papel potencial y considerable como agentes de biofertilizantes (Bidwell, 1979; Devlin, 1980; Arsac, 1990; Parke, 1991; Sacon, 1993; Bashan, 1996). Sin embargo, las investigaciones referentes a bacterias promotoras de crecimiento y plantas halófitas son escasas. Por lo que es necesario realizar estudios sobre halófitas y el medio ambiente que les rodea con la finalidad de ampliar la gama de bacterias fijadoras de nitrógeno endémicas, conocimiento de la densidad de inóculo, fisiología de cepas promotoras, su inoculación en diferentes cultivos, ecología a nivel de rizosfera entre otros aspectos.

Referente a *Salicornia bigelovii* y el aislamiento de bacterias indígenas asociadas a la rizósfera, si bien las investigaciones relacionadas con estudios a nivel de rizósfera no son tan abundantes como en otras especies (Reinhold *et al.*, 1987; Hamdi, 1999; Ungar, 2000; Rojas *et al.*, 2001), algunos estudios (Booth *et al.*, 1988; Goodfriend *et al.*, 2000; Hilderbrandt *et al.*, 2000; Bagwell *et al.*, 2001) mencionan la posible presencia de este tipo de microorganismos.

El presente trabajo muestra y confirma que la asociación de bacterias benéficas asociadas a la rizósfera de la halófitas *S. bigelovii*, es un aporte a la investigación sobre la detección de bacterias promotoras de crecimiento vegetal con posible potencial agrícola, y donde es necesario conocer la influencia positiva sobre las plantas; ya que estudios previos

concernientes a la producción de halófitas (Mc Graw y Ungar 1981; Stumpf *et al.*, 1986; Ungar, 2000), la productividad de este tipo de plantas está limitada a la disponibilidad de nitrógeno en biomasa, entre otros aspectos. Además de que una de las actividades agrícolas que se realizan para solucionar la deficiencia de nitrógeno es el uso de fertilizantes sintéticos, lo cual frecuentemente cae en un uso indiscriminado, afectando principalmente la microflora del suelo, entre ellos los microorganismos benéficos (Martínez, 1996).

En esta investigación se realizaron estudios para evaluar el efecto de las bacterias indígenas en condiciones controladas en las etapas de germinación y estado de plántula y un estudio bajo condiciones de campo durante todo el ciclo fenológico de *S. bigelovii*.

Como una primera aproximación se realizó un estudio a nivel de rizósfera, aislando bacterias fijadoras de nitrógeno en el área de la Bahía de la Paz, B.C.S., así como la caracterización de la bacteria que presentó una alta capacidad de fijar nitrógeno (prueba de reducción de acetileno).

Los resultados indican que la obtención de bacterias fijadoras de nitrógeno mediante técnicas de cultivo utilizando medios de cultivo libres de una fuente de nitrógeno a una concentración de 0.5 M de NaCl, resultó ser apropiada para determinar la presencia de este tipo de microorganismos, ya que se lograron obtener 18 aislamientos en los cinco puntos de muestreo y en las dos etapas vegetativas muestreadas (plántula y floración) de *S. bigelovii*. Lo anterior indica que las especies microbianas no pueden existir aisladas en la naturaleza, originando posibilidades de interacciones que pueden ser benéficas o perjudiciales, antagónicas o sinérgicas (Brock *et al.*, 1987). El antagonismo estaría dado por el daño existente para uno o ambos organismos y el sinergismo por las interacciones entre bacterias que puedan efectuarse por medio del intercambio de nutrimentos, por la remoción de algunos productos inhibitorios o por medio de mecanismos físicos y químicos, tales como en la concentración de oxígeno o en

el potencial óxido-reducción (Bashan y Holguin, 1997 a). Este último aspecto reviste un marcado interés para utilizarlas como biofertilizantes ya sea de manera aislada o utilizadas en co-inoculación (Khammas y Kaiser, 1992).

Por otra parte, en el estudio de reducción de acetileno de los 18 aislamientos, la bacteria halotolerante *Klebsiella pneumoniae*, fue la única que mostró una alta actividad comparada con el control halotolerante *Azospirillum halopraeferens* (Fig. 6.1.1.1.B). Lo anterior es indicativo para inferir que en estudios de bacterias por separado, las mismas pueden disminuir su capacidad para reducir el acetileno. Dicha aseveración pudo deberse a que la ausencia de la interacción de estas bacterias fijadoras de N₂ con otros microorganismos diazotróficos, al parecer promueven o inhiben su actividad, lo cual es común entre microorganismos (Drodowicz y Ferreira, 1987; Will y Sylvia, 1990; Isopi *et al.*, 1995; Halsall y Gibson, 1989; Holguin *et al.*, 1992, Holguin y Bashan, 1996; Ronkko *et al.*, 1993; Rojas *et al.*, 2001).

Los análisis de identificación y caracterización de la bacteria con alta actividad reductora de acetileno mostraron que se trata del género-especie *Klebsiella pneumoniae*, la cual se ha encontrado en forma natural en suelo y agua así como también asociada a plantas de manera endófitas (Ladha *et al.*, 1983; Das, 1991; Bredha *et al.*, 1994; Shloter y Hartmann, 1998; Chelius y Triplett, 2000). Sin embargo, en ambientes salinos, en especial para *S. bigelovii*, el presente estudio, es el primer reporte que se tiene de dicho microorganismo.

Por otra parte, para la generación de una nueva planta, uno de los primeros procesos fisiológicos que ocurren es la germinación de semillas, la cual comprende una serie de procesos que comienzan con la imbibición de agua y culminan con la emergencia de la plántula

a través de las cubiertas del endospermo, aunado a ello, factores determinantes como la humedad, oxígeno, luz y temperatura (Salisbury y Ross, 1994; Sacon, 1993; Ortegón *et al.*, 1993; Ondarza, 1996). Estudios relacionados con la germinación en halófitas indican que en la mayoría de estas especies, el porcentaje máximo de germinación se realiza conforme el contenido de sales disminuye. En forma natural, éste fenómeno se lleva a cabo cuando el período de lluvias presenta su máxima precipitación favoreciendo la disminución en el contenido de sales en el suelo (Breen *et al.*, 1977; Ungar, 1977; Ungar 1982; Ayala y O’Leary, 1995; Zalba y Peinemann, 1998). Un comportamiento similar lo presentan también las semillas de glicófitas (Murillo-Amador *et al.*, 2000). Como una segunda aproximación, se evaluó el efecto de la germinación de *S. bigelovii*. Una modalidad que no se ha reportado para *Salicornia* es la de someter la semilla a diferentes niveles de salinidad pero con la interacción de microorganismos benéficos tales como *Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens*.

Los resultados del presente estudio (Fig. 6.2.1, y Tabla 6.2.3) mostraron que al evaluar los dos genotipos (Silvestre y SOS-10), el porcentaje de germinación se redujo por el efecto de la salinidad, coincidiendo con numerosos estudios, donde arriba del 5% de NaCl (0.856 M), inducen a las semillas a un estado de latencia (Khan *et al.*, 1976; McGraw y Ungar, 1981; Philipupilla y Ungar, 1984). Sin embargo, dicho efecto (% germinación) en condiciones de NaCl, se vió mitigado por la inoculación de las bacterias, las cuales favorecen diversos procesos fisiológicos de las plantas debido a la producción de hormonas, capaces de influir en la velocidad del metabolismo, así como en la respiración de la semilla y posterior desarrollo de la raíz hospedada según Conrad *et al.*, (1992); Kozyrovskaya *et al.*, (1990); Zexun and Wei, (2000) y Haahtela *et al.*, (1990). De la misma manera se reporta que un grupo importante de reguladores como son las giberelinas, estimula la germinación en halófitas al igual que en glicófitas bajo condiciones de salinidad (NaCl), produciendo efectos positivos como la

interrupción de latencia y el incremento de biomasa (Khan, 1971; Ungar, 1978 (a); Ungar, 1978 (b); Ungar, 1982; Ville, 1986; Ondarza, 1996, Ungar, 2000). El mismo efecto anterior descrito para el factor salinidad, repercutió con una tendencia de disminución de unidades formadoras de colonias (UFC) adheridas al sistema radicular. Sin embargo, la interacción de bacterias con ambos genotipos mostró que *A. halopraeferens* no era tan afectado cuando fue inoculado con *S. bigelovii* cv. SOS-10 como con el genotipo silvestre, mientras que para el caso de la bacteria *K. pneumoniae* sucedía lo contrario. Esta especificidad de asociación planta-bacteria hasta la fecha es discutible de acuerdo con hallazgos publicados por Arsac *et al.*, (1990), Baldani y Dobereiner (1980) quienes indican que este tipo de resultados puede depender de la especificidad de la planta así como del tipo de especie de microorganismo.

Una vez generada una nueva planta, el sistema radicular ejerce un papel muy importante para el sustento de la misma (Salisbury y Ross, 1994), ya que además de ser esa interfase entre la vida terrestre y el sustrato mineral proveedor de los elementos minerales, es una región de alta actividad metabólica como resultado de las asociaciones planta-microorganismo (Whipps, 2000). La inoculación de microorganismos benéficos a nivel de rizósfera y el establecimiento exitoso como colonizadores radiculares juega un papel muy importante, ya que además de tomar en cuenta las características propias de la bacteria (respuesta quimiotáctica genotipo de la planta, agua de percolación, microflora nativa del suelo). Existen otros aspectos que deben ser considerados como son la técnica (tipo y forma) de inoculación, la cual debe ser práctica, económica y fácil de manejar, además de que el producto formulado debe proveer inóculo suficiente para la planta y tener una viabilidad de almacenamiento largo (Fages, 1992).

Actualmente se utilizan algunos métodos para inocular bacterias, el más simple es aplicando las bacterias en suspensión líquida, ya sea directamente al suelo o a las semillas. Esta técnica se ha utilizado en numerosos experimentos de invernadero y de campo (Fages, 1992). Otra opción es mediante esferas o encapsulados bacterianos en una matriz de alginatos, la cual se considera como un acarreador químicamente inerte (similar al polvo de mármol, arena o carbonato de calcio), seco, fácil de usar, uniforme, biodegradable por organismos del suelo y de naturaleza no tóxica. Los resultados muestran que el tratamiento correspondiente a la bacteria *A. halopraeferens*, utilizando la vía de esferas, promueve el crecimiento de la planta (Tabla II del tercer estudio). Lo anterior puede deberse a que la matriz juega un papel importante para contener una población bacteriana vasta y uniforme, que permite la liberación gradual de las bacterias durante períodos largos hasta de un mes. En estudios referentes a inoculantes encapsulados, aún cuando hayan sido inoculados en otras especies vegetales, los resultados son similares (Bashan, 1986). Sin embargo, el encapsulamiento debe ser eficientado, ya que según Bashan, *et al.* (2002), el uso de macroesferas presenta desventajas como son la difusión de O₂, limitando la inhabitabilidad hasta en un 80% del volumen de las esferas y la movilización de la bacteria desde las macroesferas hasta el sistema radicular provocando posteriores reinoculaciones. Dicho evento pudo haber provocado que en el presente estudio no se presentaran diferencias significativas en el crecimiento del sistema radicular (Tabla 6.3.A y 6.3.B).

Por otra parte, una de las principales vías para desarrollar nuevos cultivos con potencial productivo, es realizar investigaciones previas considerando entre otros parámetros la condición nutrimental y de crecimiento. Las inoculaciones de plantas con bacterias benéficas como son las fijadoras de N₂, son una práctica agrícola importante, debido a la capacidad de

promover el crecimiento y porque representan un papel importante en el ciclo del nitrógeno. La importancia para ampliar la gama, introducir y aplicar este tipo de bacterias en condiciones de zonas áridas ha aumentado durante la última década (Abaidoo *et al.*, 1990; Arsac *et al.*, 1990; Hamdi, 1999).

En el cuarto estudio sobre la evaluación bajo condiciones de campo, la inoculación de *Klebsiella pneumoniae* fue comparada con *Azospirillum halopraeferens* en los dos genotipos de *S. bigelovii* (Silvestre y SOS-10). En las variables analizadas a lo largo de las etapas fenológicas, los tratamientos mostraron ser sensibles a la inoculación bacteriana. La tasa de germinación fue influenciada positivamente, pero el porcentaje de germinación no fue afectado positivamente (Fig. 6.4.1). Por otro lado, la altura de planta y la longitud de la raíz fueron considerados variables apropiadas para diferenciar entre *K. pneumoniae* y *A. halopraeferens* en ambos genotipos, evidenciando que los resultados fueron positivos debido a la inoculación de las bacterias en estudio (Fig. 6.4.2. y 6.4.3.C). Asimismo, los resultados experimentales de campo mostraron que la inoculación en ambos genotipos también fue notable en la proporción lipídica, proteínas, humedad y ceniza en el sistema radicular, tallo y parte aérea, cuando fueron comparadas con los genotipos no inoculados (Tabla 6.4.4).

Bajo las condiciones experimentales, la bacteria *K. pneumoniae* resultó tener compatibilidad para el genotipo Silvestre, mientras que *A. halopraeferens* para el genotipo SOS-10. Este efecto se constató también en la fase fisiológica de producción donde fueron encontradas diferencias significativas ($P < 0.05$) para las variables biomasa seca (g m^{-2}) y semilla (g m^{-2}) (Tabla 6.4.5 y 6.4.6.A). Los resultados relacionados con incrementos en el rendimiento, bajo las condiciones de campo dadas y debido al efecto benéfico por *K. pneumoniae* y *A. halopraeferens* en las plantas de *Salicornia*, sugieren la factibilidad de sustituir fertilizante nitrogenado. Lo anterior implica la posibilidad de la posible introducción de

bacterias benéficas como *K. pneumoniae* y *A. halopraeferens* a plantas halotolerantes con potencial productivo como *S. bigelovii* en áreas productoras agrícolas de zonas semiáridas y costeras (Bashan *et al.* 2000). Sin embargo, es necesario investigar aún más en el destino de las inoculaciones en rizósfera de la halófito *Salicornia bigelovii*, por lo que en este sentido, es deseable dirigir estudios complementarios sobre este recurso vegetal y su interacción con bacterias benéficas.

8. CONCLUSIONES GENERALES

De acuerdo con los objetivos planteados, en este trabajo se logró determinar la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a la rizósfera de *S. bigelovii*, indicando que un nivel de diversidad bacteriana también existe *in situ*. Asimismo, se confirmó que son una fuente de nitrógeno para la planta debido a la suma de interacciones entre diferentes miembros de la comunidad microbiana de la rizósfera.

El aislamiento y caracterización de *Klebsiella pneumoniae* y otras especies identificadas asociadas a la rizósfera como *Rhizobium* spp son el primer reporte en *S. bigelovii*; es de esperarse que las interacciones *in situ* serán mucho más complejas debido a la gran diversidad microbiana de la rizósfera.

La evaluación de la bacteria *Klebsiella pneumoniae* (fijadora de nitrógeno), comparada con la halotolerante *Azospirillum halopraeferans*, en las condiciones experimentales en que se desarrolló el presente estudio originó las siguientes conclusiones:

El efecto de la salinidad en la germinación de *S. bigelovii* es afectado negativamente. Sin embargo, la inoculación de las bacterias *Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferans* y mitigan ese efecto negativo, promoviendo la germinación de la semilla.

Los resultados experimentales de campo, mostraron que la inoculación en ambos genotipos también fue notable en la proporción lipídica, proteínas, humedad y ceniza en el sistema radicular, tallo y parte aérea cuando fueron comparadas con los genotipos no inoculados.

Bajo las condiciones experimentales, la bacteria *K. pneumoniae* resultó tener compatibilidad para el genotipo Silvestre y *A. halopraeferens* para el genotipo SOS-10, constatándose también en la fase fisiológica de producción donde se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) para las variables de producción.

Los resultados obtenidos relacionados con incrementos en el rendimiento bajo las condiciones de campo dadas y debidos al efecto benéfico de *K. pneumoniae* y *A. halopraeferens* y en las plantas de *Salicornia*, sugieren la factibilidad de sustuir fertilizantes nitrogenados donde las producciones de biomasa y semilla son significativas en comparación de los controles no inoculados.

Se reafirma la posible y viable introducción de bacterias benéficas como *K. pneumoniae* y *A. halopraeferens* a plantas halotolerantes con potencial productivo como *S. bigelovii* en áreas productoras agrícolas de zonas semiáridas y costeras.

Finalmente, es importante mencionar que este tipo de trabajo experimental contribuye a ampliar el conocimiento en las posibles alternativas de producción agrícola y efectos en la aplicación de biofertilizantes en nuevos materiales vegetativos con potencial productivo de interés socio-económico para Estados con problemas de disponibilidad de agua de buena calidad, como es el de Baja California Sur, en el Noroeste de México.

9. PERSPECTIVAS

La fijación de nitrógeno en ambientes donde se desarrolla la halófito *S. bigelovii* puede ser un aporte significativo de dicho macronutriente para el sostenimiento de la producción primaria de este tipo de plantas, por lo que se requiere analizar como interviene la fijación de nitrógeno en el desarrollo y sostenimiento de *Salicornia*.

Es importante estudiar con mayor énfasis en como interactúan y compiten las bacterias promotoras de crecimiento con otros miembros de la comunidad microbiana nativa de la rizósfera de *Salicornia*, sobre todo si se pretende desarrollar un sistema de inoculación exitoso que pueda repercutir en la producción agrícola.

Son necesarias más investigaciones a nivel de campo para evaluar el potencial de la halófito *Salicornia bigelovii* y ser introducida en áreas con problemas de salinización como son diversas regiones en la península de Baja California. Aunado a lo anterior, la aplicación de biofertilizantes como son *Klesiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens*, que proveen nuevos conocimientos en su eficiencia.

Las zonas costeras representan una fuente de recursos naturales muy importante, por lo que sería de vital importancia el estudio a escala local de la implementación de *S. bigelovii* bajo las condiciones de la Bahía de La Paz, con la participación del sector pesquero.

Realizar experimentación en la biorremediación de los suelos en las zonas agrícolas utilizando *S. bigelovii* y la inoculación de microorganismos promotores de crecimiento como *Klesiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens*.

Es deseable estudiar las respuestas de otros cultivos (glícófitas y halófitas) que se desarrollan en la región y/o que tengan potencial productivo, con la inoculación de los microorganismos estudiados en esta investigación.

Es importante la ampliación de la gama de microorganismos diazotróficos indígenas de la región (capacidad halotolerante) y su posterior estudio con plantas cultivadas en suelos salinos.

Para incrementar la factibilidad de aplicación, deben desarrollarse y proponerse técnicas de inoculación a nivel campo.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Arsac, J., Lamothe, C. y Fages, J. 1990. Growth enhancement of Maize (*Zea Mays*) through *Azospirillum lipoferum* inoculation: effect of plant genotype and bacterial concentration. *Agronomie*, 10: 640-654.
- Albrecht, S., Okon, L., Lonquist, Y. y Burris, R. 1981. Nitrogen fixation by corn-*Azospirillum* associations in a temperate climate. *Crop Science*, 21: 301-306.
- Arredondo, V., Cordero, E., Herrero, C., and Abalde, J. 1997. Manual de técnicas bioquímicas aplicadas en fitología. (Eds Centro de Investigación Científica y Estudios Superiores de Ensenada, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste y Universidad de Coruña). La Paz, Baja California Sur, México, 70 p.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Serdam, J., Smith, I. and Struthl K. 2002. Short protocols in molecular biology. In: A compendium of methods from current protocols in molecular biology. 1a edition. Ed. Wiley NY., 580 p.
- Ayala, F. and J. O'Leary. 1995. Growth and physiology of *Salicornia bigelovii* Torr. at suboptimal salinity. *International Journal of Plant Sciences*, 156:197-205.
- Barnes, H., and Blachstock, J. 1973. Estimation of lipids in marine animal and tissues: detailed investigation of sulphophosphanil method for 'total' lipids. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*, 12: 103-118.
- Baldani, V. and Dobereiner, L. 1980. Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biology & Biochemistry*, 12: 443-439
- Bashan, Y. 1986. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for the slow release of bacteria that affect plant growth. *Applied Environmental Microbiology*, 51: 1089-1098.

- Bashan, Y. and Holguin, G. 1997 (a). *Azospirillum*-plant relationship: environmental and physiological advances (1990-1996). *Journal Microbiology*, 43: 103-121.
- Bashan, Y. and Holguin G. 1997 (b). Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (Plant Growth- Promoting Bacteria) and PGPB. *Soil Biology & Biochemistry*, 30: 1225-1228.
- Bashan, Y., Holguin, G., and Ferrera, C. 1996. Interactions between plants and beneficial microorganisms. *Terra*, 14: 159-227.
- Bashan, Y., Moreno, M. and Troyo, E. 2000. Growth promotion of the seawater-irrigated oilseed halophyte *Salicornia bigelovii* inoculated with mangrove rhizosphere bacteria and halotolerant *Azospirillum* spp. *Biology and Fertility of Soils*, 32: 265-272
- Bashan, Y., Ream, Y., Levanony, H. and Sade, A. 1989. Non-specific responses in plant growth, yield, and root colonization of noncereal crop plant to inoculation with *Azospirillum brasilense* cd. *Canadian Journal Botany*, 67: 1317-1324
- Bashan, Y., Hernández, J.P., Leyva, L. and Bacilio, M. 2002. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 35: 359-368.
- Bagwell, Ch., Dantzler, M., Bergholz, P. and Lovell, Ch. 2001. Host-specific ecotype diversity of rhizoplane diazotrophs of the perennial glasswort *Salicornia virginica* and selected salt marsh grasses. *Journal Aquatic Microbiol Ecology*, 23: 293-300
- Barnes, H. and Blachstock, J. 1973. Estimation of lipids in marine animal and tissues: detailed investigation of sulphophosphovanil method for 'total' lipids. *Journal Experimental Mar Biology and Ecology*, 12: 103-118.
- Beinjerinck, M.W. 1925. Uber ein Spirillum. *Welches freien tionskr.Adt.*2,63:353-359
- Bidwell, R., J. 1979. *Fisiología vegetal*, ed. A.G.T. editores S.A., p 454-468

- Bredha, J., Kreme, R., and Brown, J. 1994. Indications of associative nitrogen-fixation in eastern gamagrass. *Journal of Range Management*, 47: 192-195
- Blackmer, A. and Scheppers, J. 1995. Use of a chlorophyll meter to monitor nitrogen status and schedule fertigation for corn. *Journal of Production Agriculture*, 8: 56-60.
- Bligh, E. and Dyer, W. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry and Phisyology*, **37**, 911-917.
- Breen, C., Everson, C., and Rogers, K. 1977. Ecological studies on *Sporobolus virginicus* (L) Kunth with particular reference to salinity and inundation. *Hydrobiologia* 54: 135-140.
- Brock, T., Smith D. and Madigan, M. 1987. *Microbiología* cuarta edición. Prentice may. México, 906 p.
- Booth, T., Gorrie, S. and Mushin. T. 1988 Life strategies among fungal assemblages on *Salicornia europaea* aggregate. *Journal Mycologia*, 2: 176-191.
- Buckman, H. y Brady, N. 1977. *Naturaleza y propiedades de los suelos*. Ed. Montaner y Simon S.A. España, 589 p.
- Carrillo, A., Puente, M., Castellanos, T, y Bashan, Y. 1998. *Aplicaciones Biotecnologicas de Ecologia Microbiana. Manual de Laboratorio*. Pontificia Universidad Javeriana, Santafé de Bogotá, Colombia- Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste La Paz, Baja California Sur, México, 51p.
- Carlson, J. 2000. Three guys against the world's salt deserts. *Land Owner*. 22:3-6.
- Castellanos, C. 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 S.C. La Paz, B.C.S. México, p. 7.

- Castellanos, C.T. 2002. Detección de microalgas mediante la técnica “conformaciones polimórficas de una sola cadena” (SSCP). En: Curso de Aplicaciones Biotecnológicas del Cultivo de Microalgas. CIBNOR. La Paz, B.C.S.
- CICESE-Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 2000. Baja California Coastal Wetlands Inventory. <http://ecologia.cicese.mx/~proester/inv/>
- Comisión Nacional del Agua .2001. Boletín Mensual del Observatorio de la Paz, B.C.S. Gerencia Estatal de Baja California Sur, México, 54 p.
- Conrad, K., Bettin, B., and Neumann, S. 1992. The cytokinin production of *Azospirillum* and *Klebsiella* possible ecological effects. In: M. Kaminek et al. (eds), Physiology and biochemistry of cytokinins in plants. Symposium Liblice, República de Checoslovaquia, pp. 401-405
- Coombs, J., May, S., Long, D. y Scurlock, J. 1988. Técnicas en fotosíntesis y bioproductividad. Asociación de Postgraduados, Chapingo, Edo. de México: Texcoco, México, pp. 1-204
- Chelius, M. and Triplet, E. 2000. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Z. mays* L. Applied and Environmental Microbiology, 66:783-787
- Das, H. 199. Biological nitrogen-fixation in the context of indian agriculture. Current Science, 60: 551-555.
- De Troch P. and Vaderleyden J. 1996. Surface properties and motility of *Rhizobium* and *Azospirillum* in relation to plant root attachment. Microbiology Ecology, 32:149-169.
- Devlin, R. M. 1980. Fisiología vegetal. ed. OMEGA, México, D.F., 517 p.
- Díaz, V., Ferrera, C., Almaraz S. and Alcántar, G. 2001. Inoculation of plant growth-promoting bacteria in lettuce. Terra, 19, 327-335.

- Drozdowiez, A. and Ferreira, S. 1987. Nitrogenase activity in mixed cultures of *Azospirillum* with other bacteria. *Zentrablant fur Mikrobiologie*, 142: 487-493.
- Ellen, E. and Cuuningham, G. 1983. Effects of vesicular-arbuscular micorrhizae on *Distichlis spicata* under three salinity levels. *New Phytology*, 93: 227-233.
- 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. *Biology and Fertility of Soils*, 29:377-381.
- El-Shatnawi, M. and Makhadmeh, I. 2001. Ecophysiology of the Plant-Rhizosphere System. *Journal Agronomy and Crop Science*, 187: 1-9.
- Fages, J. 1992. An industrial view of *Azospirillum* inoculants: formulation and application technology. *Symbiosis*, 13: 15-26.
- Fallik, E., Okon, Y. and Fisher, M. 1988. Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation: Effect of soil organic matter content, number of rhizosphere bacteria and timing of inoculation. *Soil Biology & Biochemistry*, 20: 45-49.
- Gallawa, P. 1996. First international technical seminar for *Salicornia*. Proceedings. Halophyte Enterprises Incorporated Planetary Design Corporation Genesis. Kino Bay, Sonora, Mexico, 97 p.
- Gamo, T. and Sang, B. 1990. Growth-promoting *Azospirillum* spp isolated from rice roots of several non-gramineus crops in Japan. *Soil Science Plant Nutrition*, 37: 455-461
- Glenn, E., Brown J., and O'Leary J. 1998. Irrigating crops with seawater. <http://www.scram.com/1998/0898issue/0898glenn.html>. *Science. American*, 279: 76-81
- Glenn, E., Hicks, N. and Riley, J. 1995. Seawater irrigation of halophytes for animal feed. *Environmental Research Laboratory, Tucson Arizona*, p 221-234

- Glenn, E., Lewis T. and Moore D. 1994. Synthesis of selected reseach results on *Salicornia bigelovii*. Halophyte Enterprises, Inc., 60 p.
- Glenn, E. and O'Leary, W. 1984. Relationship between salt accomulation and water content of dicotyledonous halophytes. *Plant Cell and Enviroment*, 7:253-261
- Glenn, E., O'Leary J. and Corolyn, W. 1991. *Salicornia bigelovii* Torr.: an oilseed halophyte for seawater irrigation. *Science*, 251:1065-1067.
- Greenway, H. and Munns, R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Review Plant Physiology*, 31:149-190.
- Goodfriend, W., Olsen, M. and Frye, R. 2000. Soil microfloral and microfaunal response to *Salicornia bigelovii* planting density and soil residue amendment. *Plant and Soil*, 1: 23-32.
- Haahtela, K., Ronkko, R., Laaskso, T., Williams, P. and Korhonen, T. 1990. Root-associated *Enterobacter* and *Klebsiella* in *Poa pratensis*: Characterization of an iron-scavenging system and a substance stimulating root hair production. *Molecullar Plant-Microbe Interaction*, 3: 358-365.
- Halsall, D. and Gibson, A. 1989 Nitrogenase activity of a range of diazotrophic bacteria on straw breakdown products and related compounds. *Soil Biology & Biochemistry*, 21: 291-298.
- Hamdi, H. 1999. Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63: 968-989.
- Hardy, R., Holsten, R., Jackson, E., and Burns, R. 1968. The acethilene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*, 43: 1185-1207.

- Hildebrandt, U., Janetta, K., Ouziad, F., Renne, B., Nawrzth, K. and Bothe, H. 2000. Arbuscular mycorrhizal colonization of halophytes in Central European salt marshes. *Journal Mycorrhiza*, 4: 175-183.
- Holguin, G., Guzmán, M. and Bashan, Y. 1992. Two new nitrogen fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees: their isolation, Identification and *in vitro* interaction with rhizosphere *staphylococcus* sp. *Microbiology Ecology*, 101: 207-216.
- Holguin, G., and Bashan, Y. 1996 Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp) *Soil Biology & Biochemistry*, 28: 1651-1660.
- Isopi, R., Fabbri, P., Del Gallo, M. and Puppi G. 1995. Dual inoculation of *Sorghum bicolor* (L). Moench ssp. *bicolor* with vesicular arbuscular mycorrhizae and *Acetobacter diazotrophicus*. *Symbiosis*, 18: 43-55.
- Itai, C., Richmond, A. and Vaadia, Y. 1968. The role of root cytokinins during water and salinity stress. *Journal Botany*, 63: 694-701.
- Jefferies, R. 1981. Osmotic adjustment and the response of halophytic plants to salinity. *Bioscience*, 31: 42-48.
- Jiménez, D.R., Virgen, C.G., Tabares, F.S. and Olalde, P.V. 2001. Bacterias promotoras de crecimiento de plantas: agro-biotecnología. Avance y perspectiva: p. 395-400.
- Jena, P., Adhya, T. and Rao, V. 1992. Nitrogen fixation in *Azospirillum* sp. isolated from rice and soil as influenced by carbofuran and combined nitrogen *Zentralbl Microbiology*, 147: 340-344
- Jensen, A. 1985. The effect of cattle and sheep grazing on salt-marsh vegetation at Skalingen, Dinamark. *Vegetation*, 60:37-48

- Jeyarani, P. and Ungar, I. 1984. The effect of seed dimorphism on the germination and survival of *Salicornia europaea* L. populations. *American Journal Botany*, 71: 542-549
- Jones, R. 1998. Irrigating crops with seawater. *Scientific American* feature article. Research Laboratory Tucson, Arizona, 20 p.
- Kapulnik, Y., Okon, Y. and Kigel, J. 1981. Effects of temperature, nitrogen fertilization and plant age on nitrogen fixation by *Setaria italica* inoculated with *Azospirillum brasilense* (strain cd). *Plant Physiology*, 68:340-343
- Kim, C. and Weber, D. 1985. Distribution of VA mycorrhiza on halophytes on inland salt playas. *Plant Soil*, 83: 207-211.
- Kahammas, K. and Kaiser, P. 1992. Pectin decomposition and associated nitrogen fixation by mixed cultures of *Azospirillum* and *Bacillus* species. *Canadian Journal Microbiology*, 38: 794-797.
- Khammas, K., Ageron E., Grimont, P., and Kaiser, P. 1989. *Azospirillum irakense* sp. Nov. a nitrogen-fixing bacterium associated with the rice roots and rhizosphere soil. *Microbiology*, 140: 679-693.
- Khan, A., Gul, B. and Weber, D. 1971. Germination responses of *Salicornia rubra* to temperature and salinity. *Journal of Arid Environments*, 45: 207-214.
- Khan, M., Khan, I. and Khizar, T. 1976. Plant growth regulators from species differing in salt tolerance as affected by soil salinity. *Plant Soil*, 45: 269-276.
- Kloepper, J. Schippers, B., and Bakker P. 1992.. Proposed elimination of the term endorhizosphere. *Phytopathology*, 82: 726-727.
- Kozyrovskaya, N., Makitruk, V. and Rukdashel, E. 1990. Nitrogen fixing *Klebsiella*- spp produces IAA. *Biopolim Kletka*, 6: 93-96

- Ladha, J., Barraquio, W. and Watanabe, I. 1983. Isolation and identification of nitrogen-fixing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella planticola* associated with rice plants. *Canadian Journal of Microbiology*, 29: 1301-1308
- Lieth, H. and Masoom, A. 1993. Towards the rational use of high salinity tolerant plants. In: *Tasks for vegetation Science*, Vol. 28. Kluwer Academic Publisher.
- Mc Cabe, J. 1995. *Salicornia*. <http://solstice.Crest.org/efficiency/strawbale-list-archive.old/1405.html>
- Mc Faddin, J. 1991. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina, 301 p.
- Mc Graw, D. and Ungar, I. 1981. Growth and survival of the halophyte *Salicornia europaea* L. under saline field conditions. *Ohio Academic Science*, 81: 109-113.
- Magalhaes, F., Baldani, J., Souto, S., Kuykendall, J., and Bodereiner, J. 1983. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *Academia Brasileña de Ciencias*, 55: 417-430
- Maguire, J. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2:176-177.
- Manovsky, E. 1982. Identificación de bacterias fitopatógenas. Universidad Autónoma Chapingo. México, D.F., 84 p.
- Martínez, B. 1996. Producción agraria ecológica. En: *Revista de desarrollo rural y cooperativismo agrario*. Universidad de Zaragoza. Vol. 5. <http://cederul.unizar.es/revista/inicio.htm>
- Mass, E., and Grieve, C. 1990. Salt tolerance of plants at different growth stages. *Proceeding of the International Conference*, Tardo, Jam, Pakistan, 20 p.
- Mizrahi, Y., Blumenfeld, A. and Richmond, A. 1970. Abscisic acid and transpiration in leaves in relation to osmotic root stress. *Plant Physiology*, 45: 169-173.

- Mota, U. 1980. Las halófitas en el siglo XXI. En: Primera reunión nacional sobre ecología, manejo y domesticación de las plantas útiles del desierto. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. Monterrey, México, p. 495-500.
- Mota, U. 1990. Seawater irrigation crops *Salicornia* (SOS7) as an example. The University of Arizona, Tucson Arizona, 12 p.
- Mota, U. 1996. Levels of fertilizer in *Salicornia bigelovii*. In: First International Technical Seminar for *Salicornia*. Proceedings. Planetary Design Corporation. Puerto Peñasco, Sonora, Mexico, 96 p.
- Mota, U. 1999. Sistemas de riego aplicados a la producción de alimentos con agua de mar. I simposium internacional sobre financiamiento para modernización de áreas de riego. Hermosillo, Sonora, México, p 5.
- Murillo-Amador, B., E. Troyo-Diéguez, H.G. Jones, F. Ayala-Chairez, C.L. Tinoco-Ojanguren and A. López-Cortés. 2000. Screening and classification of cowpea genotypes for salt tolerance during germination. PHYTON. International Journal of Experimental Botany, 67: 71-84.
- Nahidh, S. and Hakeem A. 1991. Response of wheat to dual inoculation with VA-Micorrhiza and *Azospirillum*, fertilized with NPK and irrigated with sewage effluent. Arid Soil Research and Rehabilitation, 5: 83-96.
- Neori, A. and Zskova-KonZcalova, Z. 2001. Bioactive chemicals and biological-biochemical activities and their functions in rhizospheres of wetland plants. Bottany Review, 66: 350-378.
- Negi, M., Sachdev, M. and Tilak, K. 1991. Nitrogen uptake by *Azospirillum brasilense* inoculated Barely (*Hordeum vulgare* L.) as influenced by N and P fertilization. J. Nuclear Agric. Biology, 20:25-32

- Nickle, R.W. 1991. Manual of agricultural Nematology. Chapter IV, Root - Knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. Marcel Dekker. New York,. 191- 274.
- O'Leary, J., Glenn, E., and Watson, M. 1985. Agricultural production of halophytes irrigated with seawater. *Plant and Soil*, 89:311-321
- O'Leary, J. and Prisco, J. 1970. Response to osmotically stresses plants to growth regulators. *Plant Science*, 25: 129-135.
- Ondarza, R. 1996. *Biología moderna*. ed. Trillas.México, D.F. 633 p.
- Ortega, A. y Castellanos, A. 1995. Estrategia para el manejo de la reserva de la biosfera el Vizcaino, Baja California Sur, México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, B.C.S., 131 p.
- Ortegón, P., Bustamante, L. and García, S. 1993. Taller demostrativo de pruebas de viabilidad y vigor de semillas. Centro de capacitación y desarrollo de tecnología de semillas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo Coahuila, México, 100 p.
- Okon, Y. and Labandera, G. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: and evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology & Biochemistry*, 26: 1591-1601.
- Parke, J. 1991. Root colonization by indigenous and introduced microorganisms. In: the rhizosphere and plant growth. D.L. Keister and P.B. Cregan (Eds) Kluwer Academic Publishing. The Netherlands, pp 33-42.
- Pérez, J. 1995. Pruebas de sanidad en semillas. Curso taller internacional sobre métodos de pruebas de sanidad en semillas. Departamento de Parasitología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. BuenaVista, Saltillo, Coahuila, Mexico, 43 p.
- Pérez-Silva, R. 1989. Influencia de diferentes niveles de nitrógeno y poblaciones de plantas sobre los rendimientos de maíz (*Zea mays* L.) *Agronomía Tropical*, 27: 451-459.

- Philipupiya, J. and Ungar I. 1984. The effect of seed dimorphism on the germination and survival of *Salicornia*. *American Journal Botany*, 71: 542-549
- Puente, M. and Bashan, Y. 1993. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strains on germination and seedlings growth of the giant columnar cardon cactus (*Pachycerus pringler*). *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. Ecology*, 29:283-292.
- Reinhold, B., Hurek, T., Fendrik, I., Pot, B., Gillis, M., Kersters, K., Thielmans, S. and De Ley, J. 1987. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov. a nitrogen-fixing organism associated with roots of *Kallar* grass (*Leptochloa fusca* L. Kunth). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37:43-51.
- Rennie, R. 1981. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soil. *Canadian Journal Microbiology*, 27: 8-14
- Riehl, T. and Ungar, I. 1982 Growth and ion accumulation in *Salicornia europaea* under saline field conditions. *Oecologia*, 53:193
- Rivers, W. and Weber, D. 1971. The influence of salinity and temperature on seed germination in *Salicornia bigelovii*. *Plant Physiology*, 24: 73-75.
- Riley, J. Watson, M. and Moore, D. 1992. Halophyte collection list of accessions. Environmental reseach laboratory University of Arizona, p 1-6.
- Rodelas, B., González, L., Salmeron, V., Pozo, C. and Martinez, T. 1996. Enhancement of nodulation, N₂ fixation and growth of faba bean (*Vicia faba* L.) by combined inoculation with *Rhizobium leguminosarum* by *Viciae* sp and *Azospirillum brasilense*. *Symbiosis*, 21:175-186.

- Rojas, A., Holguin, G., Glick, B. and Bashan, Y. 2001. Synergism between *Phyllobacterium* sp (N₂-fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere. *Microbiology Ecology*, 1217: 1-7
- Ronkko R., Smilander, A., Nurmiolahassila, A. and Haahtela, K. 1993. Frankia in the rhizosphere of nonhost plants- a comparison with root-associated N₂ fixing enterobacter, *klebsiella* and *Pseudomonas*. *Plant and soil*, 153: 85-95.
- Rozema, J. 1975. The influence of salinity, inundation and temperature on the germination of some halophytes and non-halophytes. *Oecology Plant*, 10:341.
- Sacon, B. 1993. Fisiología y bioquímica vegetal. ed. Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid, España, 581 p.
- San Pietro, A. 1982 (a). Biosaline. Plenum Press. United States of America. New York, 575 p.
- San Pietro A. 1982 (b). A look to the future. Biosaline Research. Plenum Press, United States of America New York, 780 p.
- Salisbury, F., and Ross, C. 1994. Fisiología vegetal. ed. Iberoamericana S.A. México, D.D., 759 p.
- SAS Institute.1996. SAS/STAT user's guide. Version 6.12 SAS, Institute, Cary, N.C. U.S.A.
- Sasser, M. 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. In *Methods in phytobacteriology*. Eds. Z. Clement. K. Rudolph and D.C. Sands. Akademiai Kiado, Budapest, pp. 199-204.
- Sato, N. and Murata, N. 1988. Membrane lipids. *Methods of Enzimology*, 167: 251-259.
- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. 1981. Alternativas alimentarias en la cuenca del Golfo de California. VI simposio sobre el medio ambiente del Golfo de California. SARH-INIFAP. Hermosillo, Son., 334 p.

- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. 1994. Manual de muestreo y procesamiento para la identificación de los principales patógenos de la papa. Dirección General de Sanidad Vegetal. México, D.F., 16p.
- Secretaría de Agricultura y Ganadería y Desarrollo Rural. 1999. Sistema ejecutivo de datos básicos. SAGAR. México, D.F., 150 p.
- Shanon, M. 1997. Adaptation of plants to salinity United States Department of Agriculture Research Service U.S. Salinity Laboratory Riverside, California, 119 p.
- Shloter, M. and Hartmann, A. 1998. Endophytic and surface colonozation of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studies with strains specific monoclonal antibodies. Symbiosis, 25: 159-179.
- Snedecor, G. 1956. Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology. The Iowa State College Press, Ames, Iowa, USA, pp. 237-290.
- Stumpf, D., Prisco, J., Weeks, J., Lindley, J. and O'Leary, J. 1986. Salinity and *Salicornia bigelovii* Torr. seedlings establishment. Water relations. Journal Experimental Botany, 37: 160-167.
- Sokal, R. and James R. 1988. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. (3rd edn). Freeman & Co, San Francisco, CA.
- Tarrand, J. Krieg, N. and Bobereiner, J. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. Nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. Nov. and *Azospirillum brasilense* sp. Nov. Canadian Journal Microbiology, 24: 967-980.
- Tebbe, Ch., Schmalenberger, Peters Sabine and Schwieger, F. 2001. Single –Strand conformation polymorphism (SSCP) for microbial Community Analysis. Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications, 162-175.

- Terrence, E. and Ungar, I. 1982. Growth and ion accumulation in *Salicornia europaea* under saline field conditions. *Oecología*, 54: 193-199
- Tien, T., Gaskins, M. and Hubbell, D. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.) *Applied Environmental Microbiology*, 20: 1016-1021
- Thorne, G. 1961. Principles of nematology. Mc Graw-Hill. New York. 391-429.
- Troyo, D., Ortega-Rubio, A., Maya, Y. and León, J.L. 1994. The effect of environmental conditions on the growth and development of the oilseed halophyte *Salicornia bigelovii* Torr in arid Baja California Sur, Mexico, *Journal of Arid Environments*, 28: 207-213.
- Turyanitsa, A., Petak, A., Nichik, M. and Petrosova, V. 1995. Capacity of *Klebsiella* bacteria to fix atmospheric nitrogen and to produce plant growth hormones. *Mikrobiol. Zh.*, 57, 28-34.
- Ungar, I. 1977. Salinity, temperature and growth regulator effects on seed germination of *Salicornia europaea* L. *Aquatic Botany*, 3: 329-335.
- Ungar, I. 1978 a. Halophyte seed germination. *Botany Review*, 44:233-264.
- Ungar, I. 1978 b. The effects of salinity and hormonal treatments on the growth and ion uptake of *Salicornia europaea*. *Actualities Botany*, 95:3-4
- Ungar, I. 1987 a. Population characteristic, growth and survival of the halophyte *Salicornia*. *Ecology*, 68: 569-575.
- Ungar, I. 1987 b. Population ecology of halophyte seeds. *Botany Review*, 53: 301-308.
- Ungar, I. 2000. Ecophysiology of vascular halophytes. Department of Botany. Ohio University. Athens Ohio. CRC Press, 209 p.
- Ungar, I. 1982. Germination ecology of halophytes. Tasks for vegetation science. Vol. 2 ed. by D.N.S. Ohio, USA. p 143-154.

- Ungar, I. 1981. Growth and survival of the halophyte in succulent halophytes *Salicornia europaea* L. under saline field conditions Ohio. *Journal Science*, 81:109-113.
- USDA, 2003. United States Department of Agriculture. http://plants.usda.gov/cgi_bin/topics.cgi?earl=plant_profile.cgi&symbol=SABI&photoID=sabi_001_avd.tif
- Will, M. and Sylvia, D. 1990. Interaction of rhizosphere bacteria, fertilizer, and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi with sea oats. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 2071-2079.
- Wipps, M. J. 2000. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Experimental Botany*, 52: 487-511.
- Wolff, S. and Jefferiers, R. 1986. Taxonomic status of dipliod *Salicornia europaea* (s.i.)(Chenopodiaceae) in northeastern North América. *Canadian Journal Botany*, 65: 1420-1426
- Wood, E. 1967. Determination of nitrate in sea water by cadmium cooper reduction to nitrite. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 47: 23-31.
- Zalba, P. and Peinemann, N. 1998. Salinity- fertility interactions on early groth of maize (*Zea mays* L.) and nutrient uptake. *Edafología*, 5: 29-39.
- Zexun, L. and Wei, S. 2000. Effect of cultural conditions on IAA biosynthesis by *Klebsiella oxytoca* SG-11. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biolgy*, 6: 66-69.