



**EFFECTO DE LA INOCULACIÓN DE *Rhodococcus fascians* Y *Azospirillum halopraeferens* EN LA GERMINACIÓN DE PALO FIERRO (*Olneya tesota* A. Gray) EN CONDICIONES DE INVERNADERO<sup>1</sup>**

**[EFFECT OF THE INOCULATION OF *Rhodococcus fascians* AND *Azospirillum halopraeferens* IN GERMINATION OF PALO FIERRO (*Olneya tesota* A. Gray) UNDER GREENHOUSE CONDITIONS]**

**Edgar O. Rueda-Puente<sup>1\*</sup>, Marisela Duarte-Medina<sup>2</sup>,  
Carmen Lizette Del Toro Sánchez<sup>3</sup>, Bernardo Murillo-Amador<sup>4</sup>,  
Jesús Ortega García<sup>1</sup>, Pablo Rangel Preciado<sup>5</sup>,  
Luis Guillermo Hernández Montiel<sup>4</sup>, Jesús Borboa Flores<sup>3</sup> and  
Francisco Javier Wong Corral<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Universidad de Sonora, Departamento de Agricultura y Ganadería, Boulevard Luis Encinas y Rosales s/n, Colonia Centro, C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, México. Email: erueda04@santana.uson.mx

<sup>2</sup>Estudiante de doctorado. Instituto de Ciencias Agrícolas-Universidad Autónoma de Baja California. Ejido Nuevo León, Mexicali Baja California, México., CP 21705.

<sup>3</sup>Departamento de investigación y posgrado en alimentos, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro, Hermosillo, Sonora, México. Apartado postal 83190.

<sup>4</sup>Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo Santa Rita, La Paz, Baja California Sur. Apartado postal 23090.

<sup>5</sup>Instituto Tecnológico de Torreón. Carretera Torreón-San Pedro Km 7.5. Ejido Ana. Torreón, Coahuila, México.

\*Corresponding author

## RESUMEN

Las bacterias promotoras de crecimiento en plantas (BPCP) son un grupo de diferentes especies de bacterias que pueden incrementar el crecimiento y productividad vegetal. Las cuales pueden beneficiar a las plantas a través de su propio metabolismo bacteriano (solubilizando fosfatos, produciendo hormonas o fijando nitrógeno). En la actualidad la desertificación es un fenómeno creciente en todo el mundo, la repoblación forestal es una de las soluciones comunes para combatir este problema. Los árboles destinados a la reforestación son inicialmente cultivados en invernaderos o viveros. Entre numerosas prácticas de reforestación, una alternativa que existe es la inoculación con BPCP. Una especie forestal es *Olneya tesota* que es endémica del desierto de Sonora, la cual se encuentra en peligro de extinción. El objetivo consistió en evaluar el efecto de bacterias promotoras del crecimiento de plantas *Rhodococcus fascians* y *Azospirillum halopraeferens* en la germinación y emergencia de Palo fierro bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl) en condiciones de invernadero. Se obtuvieron semillas de palo fierro de la región de Santa Ana, Sonora. Bajo condiciones de invernadero se evaluó el porcentaje de emergencia, tasa de germinación, altura, longitud radicular de planta, peso fresco y seco de planta, número de células bacterianas adheridas al sistema radicular, peso fresco y seco de la raíz. Los resultados indican que, el porcentaje de germinación y las demás variables evaluadas a los 18 meses, disminuyeron conforme la salinidad se incrementa. Sin embargo, estas cambiaron positivamente en aquellas plantas inoculadas con las bacterias *R. fascians* y *A. halopraeferens*.

**Palabras clave:** bacterias rizosféricas; fijación de nitrógeno; reforestación; salinidad.

## SUMMARY

The growth-promoting bacteria in plants (BGPB) are a group of different species of bacteria can increase plant growth and productivity. Which can benefit plants through their own bacterial metabolism (phosphate solubilizing, producing hormones or fixing nitrogen). At present, desertification is a growing phenomenon worldwide, afforestation is one of the common solutions to combat this problem. Trees for reforestation are initially grown in greenhouses or nurseries. Among numerous reforestation practices, there is an alternative that inoculation with

<sup>1</sup> Submitted September 14, 2012 – Accepted February 18, 2017. This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

PGPB. Is a forest species that is endemic *Olneya tesota* Sonoran Desert, which is in danger of extinction. The objective was to evaluate the effect of bacteria growth promoter in plants with *Rhodococcus fascians* and *Azospirillum halopraeferens* on germination and emergence of Ironwood under four salt concentrations (0, 0.25, 0.5 and 0.75 M NaCl) under greenhouse conditions. Were obtained ironwood seeds in the region of Santa Ana, Sonora. Under greenhouse conditions was evaluated emergence percentage, germination rate, height, plant root length, fresh and dry weight of plant, number of bacterial cells attached to the root system, fresh and dry weight of the root. The results indicate that the germination percentage and other variables evaluated decreased as salinity increases. However, these changed positively to inoculation with bacteria *R. fascians* and *A. halopraeferens*.

**Key words:** rhizospheric bacteria; nitrogen fixation; reforestation; salinity.

## INTRODUCCION

En México se ha designado al Palo fierro -*Olneya tesota* (A. Gray)-, como una especie con protección especial (NOM-059-ECOL-2001). Sin embargo, esto no parece suficiente para asegurar la permanencia de las poblaciones; lo anterior se debe a que la extracción de madera de Palo fierro y el efecto de la conversión del hábitat incluso ocurre al interior de las áreas protegidas (Suzán *et al.*, 1997; Suzán *et al.*, 1999). Además se ha observado en diversas investigaciones que las poblaciones localizadas en la costa central del Estado de Sonora presentan altos índices de daño por corte de madera de palo fierro, resalta también la escasa presencia de individuos jóvenes a lo largo de su distribución (Zúñiga y Zusán, 2006). El Palo fierro fue descrito en 1854 como la única leguminosa del género *Olneya* por el botánico estadounidense Asa Gray, el cual se encuentra distribuido en los estados de Sonora, Sinaloa, Baja California Norte y Sur (CONABIO-CONANP, 2009); crece en suelos con moderada profundidad, con textura arenosa, migajón-arenosa y areno-limosa, en suelos desérticos pobres en materia orgánica, es una especie muy resistente a heladas y altas temperaturas (Gurrola *et al.*, 2005; Saduño *et al.*, 2009). La existencia del Palo fierro tiene gran importancia ecológica ya que una gran diversidad de plantas perennes crece cerca o debajo de su copa. Se ha encontrado que entre 65 a más de 200 especies de plantas dependen de él para su sobrevivencia, en especial aquellas de corta vida y las anuales ya que crea un micro hábitat especial bajo su sombra (CONABIO-CONANP, 2009); dicha especie es considerada como planta fijadora de nitrógeno (Felker y Clark, 1981). La creciente demanda del sector forestal por incrementar las poblaciones de especies nativas de conservación y comercialización de alto valor económico, ecológico y ambiental, ha generado la creación de viveros donde la reproducción de Palo fierro es mediante el método convencional que consiste en la aplicación de fertilizantes químicos, lo cual influye significativamente en el incremento de la salinidad en ambientes árido-salinos como lo es el noroeste de México (Rueda *et al.*, 2009). Bajo este contexto, y sabiendo que este tipo de especies se propaga sexualmente por semilla y asexualmente por medio de varetas, acodos, esquejes, raquetas estacas

(Mayoral, 1994), se abordan múltiples estrategias para favorecer la eficacia de los procesos de emergencia de plantas jóvenes, dentro de las cuales se contempla el uso de microorganismos promotores de emergencia radicular y de crecimiento vegetal (Bashan *et al.*, 2004).

Las Bacterias Promotoras de Crecimiento de Plantas (BPCP), son microorganismos fijadores de nitrógeno atmosférico y a su vez producen hormonas que aprovechan las plantas para llevar a cabo su desarrollo (Hernández *et al.*, 2006). Estos microorganismos desempeñan un papel clave en la toma de nutrientes, la tolerancia a estrés ambiental y, en general, el mantenimiento de la salud radicular, favoreciendo así el aumento del rendimiento de los cultivos (Rueda *et al.*, 2009; Espinosa y Paredes, 2010; Loredo *et al.*, 2010; Villegas *et al.*, 2010). Muchas plantas nativas responden positivamente a la inoculación mejorando su crecimiento. Sin embargo, aquellos microorganismos nativos que crezcan y sobrevivan en suelos con alta dureza son mejores candidatos para inocular las plantas nativas. Una fuente potencial de estos microorganismos son plantas del desierto creciendo en rocas en ausencia de suelo, siendo ésta una de las condiciones que inhibe el crecimiento en la mayoría de las plantas (Narovis *et al.*, 2007). Es bien conocido que las bacterias rizosféricas tienen un efecto benéfico para el crecimiento de las plantas. Por ese motivo las rizobacterias han sido ampliamente difundidas como alternativa para reducir el uso de agroquímicos (fertilizantes) con la finalidad de disminuir costos y contaminación ambiental y preservar la salud humana (Abril *et al.*, 2006; Carcaño *et al.*, 2006; Trujillo *et al.*, 2007). Por lo anteriormente descrito, el objetivo de la presente investigación consistió en evaluar el efecto de las bacterias promotor del crecimiento de plantas *Rhodococcus fascians* y *Azospirillum halopraeferens* en la germinación y emergencia de Palo fierro (*Olneya tesota*) bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl) en condiciones de invernadero.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio Agrícola “Dr. Felix Ayala Chairez” de la

División de Ciencias Administrativas, Contables y Agropecuarias de la Universidad de Sonora, Campus Santa Ana.

### Colecta de la semilla de *Olneya tesota*.

Durante el verano (junio-julio), se colectaron semillas maduras de un árbol de Palo fierro de tres años en Santa Ana, Sonora (paralelo 30° 33' de latitud norte y 111°07' longitud oeste del meridiano de Greenwich y a 548 m de altura sobre el nivel del mar). Las semillas se depositaron en un recipiente térmico o hielera a 4 °C, para evitar que las semillas se infectaran por enfermedades y/o fueran consumidas por insectos. Las semillas se homogenizaron en base a tamaño y apariencia. Con el propósito de determinar la viabilidad de las semillas, se lavaron en agua potable siguiendo el criterio de flotabilidad, desechando aquellas que flotaron. Posteriormente se desechó el agua y se adicionó un desinfectante denominado Tween 20, al 2% y se mantuvo así durante 10 minutos en agitación constante a una velocidad de 150 revoluciones por minuto (rpm) utilizando una agitadora marca EBERBACH. Después se desechó el desinfectante Tween 20 con agua destilada estéril para eliminar los excesos del mismo. Enseguida se adicionó hipoclorito de sodio (NaClO<sub>3</sub>) al 3% y se mantuvo así durante cinco minutos en agitación constante a una velocidad de 150 revoluciones por minuto en la misma agitadora. Por último se decantó el hipoclorito de sodio y se lavaron las semillas cinco veces con agua destilada estéril para eliminar los excedentes del hipoclorito (Carrillo *et al.*, 1998).

### Evaluación de *Rhodococcus fascians* en la germinación de palo fierro (*Olneya tesota*) bajo diferentes salinidades: estudio en invernadero.

La bacteria *Rhodococcus fascians* se aisló de la rizósfera de Palo fierro del desierto de Altar Sonora, el cual se encuentra localizado a una latitud N: 31° 27' 36" a 32° 21' 36" y una longitud W: 112° 59' 24" a 114° 23' 24" (Duarte *et al.*, 2017). Los tratamientos evaluados fueron *Rhodococcus fascians*, *A. halopraeferens* Au4<sup>T</sup> DSM 3675<sup>T</sup> y un control sin inocular, sometiéndose a tres concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl); para la siembra se utilizaron cinco macetas por repetición en los 12 tratamientos de salinidad, arrojando un total de 60 unidades; se utilizó el sustrato peat-moss (Sunshine, Sun Gro Horticulture Canada, Ltd.); para la inoculación, en cada uno de los cultivos bacterianos se colocaron las semillas de cada tratamiento y en un matraz Kitazato de 250 mL, se sometieron por infiltración al vacío a 600 mm Hg por 5 Minutos (Carrillo *et al.*, 1998). Posteriormente los tratamientos se sometieron a cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl. Cada una de las semillas se sembró a una profundidad de 0.5 a 1 cm. Se

agregaron 200 mL de la solución salina correspondiente (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), con una concentración del inoculante en líquido de 1x10<sup>8</sup> UFC/mL. Los tratamientos fueron ubicados en invernadero, a una temperatura de 35 °C con una humedad relativa de 20%. Se aplicaron volúmenes de 200 mL de agua destilada estéril, así como también de la solución salina, a los tratamientos correspondientes (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl) cerciorándose de la existencia de un escurrimiento para evitar el incremento de salinidad; en el sustrato de las macetas; las aplicaciones fueron efectuadas cada tres días en cada uno de las macetas.

Las variables evaluadas fueron: porcentaje y tasa de emergencia, las cuales se desarrollaron tomando como criterio el rompimiento del sustrato. El número de semillas emergidas se realizó mediante lecturas cada dos días (tasa de emergencia) y finalmente el porcentaje de emergencia fue determinado a los 13 días. La tasa de emergencia fue calculada de acuerdo a Maguire (1962) con la ecuación:

$$M = n1/t1 + n2/t2 + \dots n13/t13$$

Donde n1, n2, ... n13 representan el número de semillas emergidas en el tiempo t1, t2, ... t13 (en días). El diseño experimental que se empleó fue un completamente al azar con 12 tratamientos con un arreglo bifactorial de 3x4 (2 bacterias y un control x 4 niveles de salinidad). Utilizando este mismo diseño, se realizaron análisis de varianza del porcentaje de emergencia transformando previamente los valores con arcoseno (Sokal y James, 1988). La tasa de emergencia, que es la suma de semillas emergidas contadas por día también fue analizada. Cuando se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, se utilizó la prueba de Rango Múltiple de Duncan ( $P < 0.05$ ). Los análisis se realizaron con el programa de cómputo SAS (SAS, 2001).

### Longitud radicular de plántula y altura de planta.

La observación se llevó a cabo a los 18 meses después, evaluándose 60 plantas (5 plantas por tratamiento de 12 tratamientos), que fueron medidas con un vernier (General, 143, General Tools, Manufacturing Co., Inc. New York, USA) y se procedió a la anotación de longitud radicular y altura de planta de cada tratamiento, cabe indicar que la altura de la planta fue considerada a partir del cuello hasta el ápice de la misma.

### Peso fresco y peso seco de plántula.

Se evaluaron 60 plantas (5 plantas por tratamiento), para determinar el peso de fresco de planta, incluyendo raíz, y fue mediante el uso de una balanza analítica Mettler-Toledo GmbH. Para el caso de peso

seco las plantas se sometieron a calor en una estufa marca Shel lab modelo 1380 FM, depositándose en platos de frigolite con la finalidad de facilitar el manejo de las plantas, las mismas que se mantuvieron a una temperatura de 110 °C por espacio de 24 horas. Al término de este periodo de secado, se pesaron y se registraron los datos.

### **Cuantificación de células bacterianas (Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) adheridas al sistema radicular de plantas de *Olneya tesota*.**

Esta prueba se llevó a cabo al finalizar el estudio (18 meses después), la cual consistió en tomar de cada tratamiento y por separado tres plantas, se cortó el sistema radicular, pesándose 100gr por planta y 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 un minuto lo que permitió el desprendimiento de las bacterias adheridas a la raíz. Posteriormente de ésta solución se tomaron directamente 100 µL y se sembraron por dispersión en placa en medio Rennie y/o OAB libre de nitrógeno (Rennie, 1981; Reinhold *et al.*, 1987). Las cajas de Petri sembradas se incubaron a 30 y 50 °C durante 24 h para cuantificar las unidades formadoras de colonia (UFC/mL). Esta prueba se realizó por triplicado.

### **Análisis bromatológicos.**

Las variables evaluadas fueron: contenido de proteínas, lípidos totales y cenizas. La técnica para obtener proteínas se desarrolló por el método micro-kjeldahl; para cenizas por diferencia de peso, calcinando la muestra a 500 °C por 24 h (Nieto *et al.*, 2011) y con relación a los lípidos totales se emplearon la técnica de Barnes y Blachstocks (1973).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Porcentaje de germinación de palo fierro bajo condiciones de invernadero**

La germinación en invernadero, de semillas de *Olneya tesota*, con los tratamientos *Rhodococcus fascians* y *Azospirillum halopraeferens* a una salinidad de 0 y 0.25 M de NaCl presentaron una germinación del 100% en comparación con el control que mostró un 67% tanto en los 0 y 0.25M de NaCl en los cuales no hubo diferencia significativa entre tratamiento ni en los diferentes concentraciones de NaCl. Por su parte a una concentración salina de 0.5 M de NaCl el tratamiento que mostró mayor porcentaje de germinación fue *R. fascians* con un 25% comparado con *A. halopraeferens* que obtuvo un 15% de germinación y el control que muestra un 12% de germinación dentro de los cuales no existe diferencia significativa entre el control y el

tratamiento de *A. halopraeferens* a un nivel de salinidad del 0.5%. Mientras que a una concentración del 0.75% M de NaCl muestran niveles muy bajos de germinación (Tabla 1). Los resultados de la inoculación con microorganismos benéficos concuerdan con Bashan y Holguín (1997), donde indican que el uso de bacterias induce a la germinación, debido a la síntesis de fitohormonas liberadas por estos microorganismos. Sin embargo, resultados muy similares se han obtenido para otras plantas (Rozema *et al.*, 1975; Puente *et al.*, 1999) y aunque los ensayos se hayan efectuado con otras plantas y otros microorganismos benéficos, algunos inhiben los efectos sobre la germinación (Díaz *et al.*, 2001).

### **Altura de plántula, longitud radicular, peso fresco de plántula y unidades formadoras de colonias (UFC/ml)**

Respecto a la altura de plántula se desarrollaron favorablemente los tratamientos con los inoculantes en estudio (*R. fascians* y *A. halopraeferens*), dentro de los cuales el valor más alto se mostró a los 0 M de NaCl con el inoculante *A. halopraeferens* con 6.14 cm, seguido de *R. fascians* con 6.11cm; sin embargo, no existió diferencia significativa entre los tratamientos. Por su parte el tratamiento control presentó un nivel más bajo (4.99 cm), a la misma concentración de 0 M de NaCl. Con relación en la concentración salina de 0.25 M de NaCl, los resultados mostraron diferencias significativas entre tratamientos inoculados comparados con el control sin inoculante. Se pudo observar que conforme se incrementa la salinidad, la altura se reduce; un similar comportamiento fue observado en la salinidad de 0.5 y 0.75 M de NaCl. Los valores más bajos fueron para los tratamientos no inoculados y considerados control (0.5 M de NaCl = 1.39; 0.75 M de NaCl = 0.10), mientras que aquellos inoculados se mostraron superiores numericamente (Tabla 1).

En longitud radicular a una salinidad de 0 M de NaCl, el tratamiento que sobresalió fue *A. halopraeferens* sobre la bacteria *R. fascians* y el control. Sin embargo en las subsiguientes salinidades (0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), sobresalieron las bacterias *R. fascians* y *A. halopraeferens* en comparación con el control (P=0.05) (Tabla 1).

Con respecto a las variables peso fresco y peso seco, los resultados muestran que no existe diferencia significativa entre los inoculantes y el control tanto en las dos concentraciones salinas de 0 y 0.25 M de NaCl. Sin embargo, al hacer uso de diferentes salinidades, el peso fresco y el peso seco se ve reducido cuando la molaridad de NaCl se incrementa; el tratamiento *A. halopraeferens* sobresalió en

comparación del control y *R. fascians*, respectivamente (Tabla 1).

El número de las células adheridas al sistema radicular, no fue afectado por las cuatro salinidades (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl en la inoculación con *R. fascians*, lo contrario ocurrió con *A. halopraeferens* que fue reducida numéricamente las unidades formadoras de colonias. Respecto al control no hubo presencia de UFC/ml en ninguna de las cuatro concentraciones salinas analizadas (Tabla 1). 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). Resultados similares se han obtenido en otras investigaciones aunque estas han sido en diferentes especies de plantas y otro tipo de bacterias benéficas (Bashan *et al.*, 2009, Rueda *et al.*, 2009, Villegas *et al.*, 2010, Rueda *et al.*, 2011).

#### Porcentaje final de emergencia de *Olneya tesota* con la inoculación de *R. fascians* y *A. halopraeferens*

Con respecto a la prueba de emergencia de *Olneya tesota*, el tratamiento *R. fascians* mostró el máximo porcentaje de emergencia de semillas a una salinidad de 0 y 0.25 M de NaCl, los resultados presentan una actividad más activa (100 y 96%), en comparación

con el tratamiento inoculado con *A. halopraeferens* que se vio reducida a un 84% a 0.25M de NaCl, comparado con la concentración salina 0M de NaCl que arrojó un nivel más bajo de emergencia (68%). Sin embargo, el control redujo los niveles de emergencia hasta un 24 y 20% a una salinidad de 0 y 0.25M de NaCl. Asimismo, se pudo observar que *R. fascians* y *A. halopraeferens* muestran niveles de germinación muy bajos a una salinidad de 0.5 y 0.75 M de NaCl comparados con el control que no mostró actividad de emergencia. Los resultados indican que la salinidad reduce la tasa de germinación, no obstante ello, *R. fascians* presenta un mayor incremento en el porcentaje final de emergencia en comparación de los demás tratamientos a una salinidad de 0 y 0.25 M de NaCl (Tabla 2).

Acorde la contenido de proteínas y lípidos, los análisis de varianza no mostraron diferencias significativas en cuanto a su proporción en los tratamientos *Rhodococcus fascians* y *A. halopraeferens*. Se encontró que las plantas inoculadas con las bacterias fijadoras de N<sub>2</sub>, resultaron en un incremento de biomasa, reflejándose en valores superiores en comparación con plántulas de *Olneya tesota* del tratamiento control. En cuanto al contenido de cenizas, se reflejó mayor variabilidad en cada tratamiento y en las diferentes salinidades (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl), (Tabla 3).

Tabla 1. Efectos de *Rhodococcus fascians* y *Azospirillum halopraeferens* en longitud radicular, altura de planta, peso fresco y peso seco de plántulas de *Olneya tesota*, bajo cuatro concentraciones de NaCl. Literales iguales en valores medios indican valores no significativos con P= 0.05. Las comparaciones fueron desarrolladas dentro de las columnas usando la prueba de rango múltiple de Duncan's. Los valores representan la media de cinco repeticiones. Bacteria (1\*10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup>).

Inoculante (Bacteria)	Salinidad NaCl M	Germinación (%)	Altura de planta (cm)	Longitud radicular (cm)	Peso fresco (mg)	Peso seco (mg)	UFC
control	0	67±20b	4.99±0.65c	5.49±0.11b	0.41±0.12a	0.17±0.03a	0
control	0.25	67±25b	4.37±0.69cd	4.47±0.12d	0.44±0.11a	0.18±0.04a	0
control	0.50	12±28d	1.39±0.13g	1.46±0.13f	0.18±0.04c	0.12±0.02bc	0
control	0.75	2±1f	0.10±0.05i	0.14±0.03g	0.12±0.03e	0.1±0.01d	0
<i>R. fascians</i>	0	100±9a	6.11±0.25a	5.50±0.13b	0.43±0.09a	0.17±0.03a	3728±189
<i>R. fascians</i>	0.25	100±16a	5.59±0.56b	4.99±0.39c	0.46±0.06a	0.18±0.02a	3422±165
<i>R. fascians</i>	0.50	25±6c	2.41±0.54f	1.93±0.17e	0.28±0.07b	0.14±0.02b	2444±132
<i>R. fascians</i>	0.75	8±3e	0.46±0.14h	0.22±0.09g	0.15±0.05c	0.12±0.02bc	3530±209
<i>A. halopraeferens</i>	0	100±8a	6.14±0.17a	5.70±0.10a	0.44±0.13a	0.18±0.03a	3999±198
<i>A. halopraeferens</i>	0.25	100±12a	5.43±0.51b	4.89±0.38c	0.43±0.17a	0.17±0.03a	2578±176
<i>A. halopraeferens</i>	0.50	15±5d	3.17±0.68de	2.35±0.12e	0.28±0.07b	0.14±0.03b	2174±187
<i>A. halopraeferens</i>	0.75	9±3e	0.31±0.10h	0.16±0.10g	0.13±0.03d	0.1±0.01d	2328±201

Tabla 2. Comportamiento de la emergencia de Palo fierro inoculado con *Azospirillum halopraeferens* y *Rhodococcus fascians* y su respectivo control sin inoculante en plántulas de Palo fierro (*Olneya tesota*), bajo cuatro concentraciones salinas (0, 0.25, 0.5 y 0.75 M de NaCl) en condiciones de invernadero. Literales diferentes indican diferencia significativa P=0.05.

Inoculante (Bacteria)	Salinidad	Días							Emergencia final (%)
		2	4	6	8	10	12	13	
<i>R. fascians</i>	0	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	5	100a
<i>R. fascians</i>	0.25	1.4	1.4	4.2	4.2	4.2	4.2	4.8	96a
<i>R. fascians</i>	0.5	0	0	0	0	0.2	0.2	0.2	4e
<i>R. fascians</i>	0.75	0	0	0	0	0	0	0	0f
<i>A. halopraeferens</i>	0	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	3.4	68c
<i>A. halopraeferens</i>	0.25	1.6	1.6	4.2	4.2	4.2	4.2	4.8	84b
<i>A. halopraeferens</i>	0.5	0	0	0	0	0.2	0.2	0.2	4e
<i>A. halopraeferens</i>	0.75	0	0	0	0	0	0	0	0f
Control	0	0	0	0	0	0.4	0.4	1.2	24d
Control	0.25	0	0	0	0	0.6	0.6	1	20d
Control	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0f
Control	0.75	0	0	0	0	0	0	0	0f

Tabla 3. Efecto de *Rhodococcus fascians* y *Azospirillum halopraeferens* en el contenido lipídico, proteína y cenizas en plántulas de *Olneya tesota*, bajo cuatro concentraciones de NaCl. Literales iguales en valores medios indican valores no significativos con P= 0.05. Las comparaciones fueron desarrolladas dentro de las columnas usando la prueba de rango múltiple de Duncan's. Los valores representan la media de cinco repeticiones. Bacteria ( $1 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>).

Inoculante (Bacteria)	Salinidad (M de NaCl)	Lípidos (mg)	Proteína (mg)	Cenizas (mg)
control	0	0.1b	10.25a	0.45c
control	0.25	0.11a	10.12a	0.70ab
control	0.5	0.0b	0.0b	0.0d
control	0.75	0.0b	0.0b	0.0d
<i>R. fascians</i>	0	0.12a	10.4a	0.45c
<i>R. fascians</i>	0.25	0.09a	10.24a	0.45c
<i>R. fascians</i>	0.5	0.11a	9.32a	0.87a
<i>R. fascians</i>	0.75	0.0b	0.0b	0.0d
<i>A. halopraeferens</i>	0	0.11a	10.18a	0.92a
<i>A. halopraeferens</i>	0.25	0.09a	10.24a	0.45c
<i>A. halopraeferens</i>	0.5	0.12a	9.31a	0.86a
<i>A. halopraeferens</i>	0.75	0.0b	0.0b	0.0d

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente investigación muestran que la germinación de *Olneya tesota* es afectado negativamente por la salinidad. Sin embargo, una alternativa existente es la inoculación con las bacterias de *Rhodococcus fascians* y *Azospirillum halopraeferens* las cuales mitigan ese efecto negativo, promoviendo la germinación de la semilla y subsecuente en etapa de plántula. Es posible la utilización de bacterias benéficas como de *R. fascians* y *A. halopraeferens* en plantas forestales con potencial para ser utilizadas en reforestación en áreas deforestadas. Finalmente, es importante mencionar que este tipo de investigaciones contribuye a ampliar

el conocimiento en las posibles alternativas de producción de plantas forestales y efectos en la aplicación de biofertilizantes, los cuales pueden ser utilizados en la agricultura y reducir en cierta medida la aplicación de agroinsumos químicos.

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por brindarme la oportunidad mediante el otorgamiento de una beca para la realización de mis estudios de doctorado. Numero de beca CONACyT: 236485. A la Universidad de Sonora Campus Santa Ana, por su apoyo durante el desarrollo de experimento.

## REFERENCIAS

- Abril, A., Biasutti, C., Maich, R., Dubbini, L., Noe, L., 2006. Inoculación con *Azospirillum* spp. en la región semiárida-central de Argentina: factores que afectan la colonización rizosférica. *Ciencia del Suelo*, 24 (1): 11-19.
- Barnes, H., Blachstock, J., 1973. Estimation of lipids in marine animal and tissues: detailed investigation of sulphophosphovanil method for 'total' lipids. *Experimental Mar Biology and Ecology*, 12: 103-118.
- Bashan, Y., Holguin, G., 1997. *Azospirillum*-plant relationship: environmental and physiological advances. *Canadian Journal Microbiology*, 43: 103-121.
- Bashan, Y., Puente, M.E., Salazar, L.E.B., de-Bashan, M.B., Hernández, J.P., Leyva, L.A., Romero, B., Villalpando R., Bethlenfalvay, G.J., 2000. Reforestación de tierras erosionadas en el desierto: el papel de las bacterias promotoras de crecimiento en plantas y la materia orgánica. *Suelos Ecuatoriales*, 35 (1):70-77.
- Bashan, Y., Holguín, G., De-Bashan, L.E., 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology*, 50: 521-577.
- Bashan, Y., Salazar, B., Puente, M.E., 2009. Responses of native legume desert trees used for reforestation in the Sonoran Desert to plant growth-promoting microorganisms in screen house. *Biology Fertility Soils*. 45: 655–662.
- Carrillo, A., Puente, M., Castellanos, T., Bashan, Y., 1998. Aplicaciones biotecnológicas de ecología microbiana. Manual de laboratorio. Eds. Pontificia Universidad Javeriana, Santa Fe de Bogotá, Colombia y Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste S. C. La Paz, Baja California Sur, México.
- CONABIO-CONANP. 2009. Palo Fierro (*Olneya tesota*). Fichas de especies mexicanas. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. México D.F.
- Duarte-Medina, M., E. O. Rueda-Puente, M. Cruz-Villegas, J. F. Ponce –Medina, L. Avendaño- Reyes, B. Murillo-Amador, L. Partida-Ruvalcaba y J. A. Villegas-Espinoza. 2017. Bacterias promotoras de crecimiento de plantas asociadas a la rizósfera de Palo fierro (*Olneya tesota*) en el desierto de Sonora. *Revista Universidad y Ciencia*. (accepted)
- Felker, P., Clark, P.R., 1981. Nodulation and Nitrogen Fixation (Acetylene Reduction) in Desert Ironwood (*Olneya tesota*). *Oecologia*, 48: 292-293.
- Carcaño-Montiel, M.G., Ferrera-Cerrato, R., Pérez-Moreno, J., Molina-Galán, J.D., Bashan, Y., 2006. Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de Maíz y Teocintle. *Terra Latinoamericana*, 24 (4): 493-502.
- Díaz-Vargas, P., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz Suárez, J.J., Alcántar-González, G., 2001. Inoculación de bacterias promotoras del crecimiento en lechuga. *Terra*, 19: 327-335.
- Gurrola, M.M., Tineo, L.G., Osorio, M., 2005. Regeneración *in vitro* de plántulas de Palo fierro (*Olneya tesota*) a partir de Callo. XI Congreso nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
- Hernández, R.A., Pérez, M.E., del Valle, G.V., Lauzardo, A.N.H., 2006. Perspectiva del empleo de rizobacterias como agentes de control biológico en el cultivo de importancia económica. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24 (1): 42-49.
- Kim, C.K., Weber, D.J., 1985. Distribution of VA mycorrhiza on halophytes on inland salt playas. *Plant Soil*, 83: 207-214.
- Loredo, O.C., López, R.L., Espinosa, V.D., 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: una revisión. *Terra Latinoamericana*. 22 (2):225-239.
- Maguire, J.H., 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2:176-177.
- Mayoral, P., 1994. Reproducción de palo fierro (*Olneya tesota*) en viveros forestales. Universidad de Sonora – Rictus y Conservación Internacional A.C.
- Nieto-Garibay, A., Troyo-Diéguez, E., Valdez-Cepeda, R.D., Rueda-Puente, E.O., García-

- Hernández, J.L., Flores-Hernández, A., Zamora-Salgado, S., Orona-Castillo, I., Murillo-Amador, B., 2011. Plant height and mineral content of *Opuntia tapona* growing along the coasts of Baja California Sur, México. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*. 13: 77-87
- Paredes, M.M., Espinosa, V.D., 2010. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*, 28 (1): 61-70.
- Puente, M., Holguin, G., Glick, B., Bashan, Y., 1999. Root-surface colonization of black mangrove seedlings by *Azospirillum halopraeferens* and *Azospirillum brasilense* in seawater. *FEMS Microbiology Ecology*, 29: 283-292.
- Narovis, R., Acebo, Y., Hernández, A., 2007. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del Arroz (*Oryza sativa* L.). *Perspectivas de su uso en Cuba. Cultivos Tropicales*, 28 (2): 29-38.
- Reinhold, B., Hurek, T., Fendrik, I., Pot, B., Gillis, M., Kersters, K., Thielmans, S., 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.J., 1981. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Canadian Journal of Microbiology*, 27: 8-14.
- Rozema, J., 1975. The influence of salinity, inundation and temperature on the germination of some halophytes and nonhalophytes. *Oecologia Plantarum*, 10: 341-353.
- Rueda-Puente, E.O., Farmohammadi, S., Moghaddam, A., Zakeri, O., 2011. Plant growth promoting bacteria associated to salicornia rhizosphere in Abbas. *Iran Agricultural Science Research*, 1 (7):155-165.
- Rueda Puente, E.O., Villegas, J.A., Gerlach, L.E., Tarazón, M.A., Murillo, B., Troya, J.L., Preciado Rangel, P., 2009. Efecto de la inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal sobre la germinación de *Salicornia bigelovii*. *Terra Latinoamericana*, 27 (4): 345-354.
- Sañudo, T.R.R., Peñate, P.V., López, C.A., Azpiroz, H.S., Campos, C., Ibarra, M.G., Félix, J.A., 2009. Tratamientos pregerminativos en semillas de Palo fierro (*Olneya tesota* A. Gray) y propagación en sustrato de composta de lirio acuático (*Eichhornia crassipes*). *Ra Ximhai*, 5 (3):329 -333.
- SAS Institute. 2001. SAS users guide: statistics. Version 6.12 SAS, Institute, Cary, NC, USA.
- Sokal, R., Rohlf, J., 1988. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. Freeman & Co. San Francisco, CA, USA.
- Suzán, H., Patten, D.T., Nabhan, G.P., 1997. Exploitation and conservation of ironwood (*Olneya tesota*) in the Sonoran desert. *Ecological Applications*, 7 (23):948-957.
- Suzán, H., Malda, G., Patten, D.T., Nabhan, G.P., 1999. Effects of exploitation and park boundaries on Legume trees in the Sonora desert. *Conservation Biology*, 13:1497-1501.
- Trujillo, I., Díaz, A., Hernández, A., Heydrich, M., 2007. Antagonismo de cepas de *Pseudomonas fluorescens* Y *Burkholderia cepacia* contra hongos fitopatógenos del Arroz y el Maíz. *Protección Vegetal*, 22 (1): 41-46.
- Villegas Espinoza, J.A., Rueda, E.O., Murillo, B., Puente, M.E., Grimaldo, O., Avilés, S.M., Ponce, J.F., 2010. Efecto de la inoculación de *Azospirillum halopraeferens* y *Bacillus amyloliquefaciens* en la germinación de *Prosopis chilensis*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12: 19-32.
- Zúñiga, T.R.B., Zusán, H., 2006. Estructura de las poblaciones de Palo fierro en la costa central de Sonora en relación al grado de daño por corte. V simposio Internacional sobre la flora silvestre en zonas áridas. Centro de las artes Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora. pp. 1126-1145.