



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCIENCIAS

**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS
DE CRECIMIENTO VEGETAL (BPCV) ASOCIADAS
AL SUELO DEL CHILTEPÍN SILVESTRE (*Capsicum
annum* L. var. *glabriusculum*) EN CUATRO
MUNICIPIOS DEL ESTADO DE SONORA.**

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRA EN BIOCIENCIAS

presenta:

MARIELENA CLARK RIVERA

Hermosillo, Sonora, México

28 de noviembre de 2019

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Maestro en Biociencias** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca de Ciencias Biológicas y de la Salud para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador del Programa del Posgrado.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

Marielena Clark Rivera

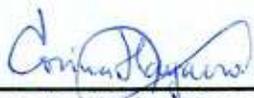
Autor

Dra. Nohemí Gámez Meza

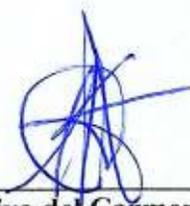
Coordinadora del Programa de Maestría en Biociencias

APROBACIÓN

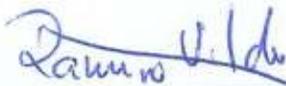
Los miembros del Comité designado para revisar la tesis intitulada “Identificación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) asociadas al suelo del Chiltepín silvestre (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) en cuatro Municipios del Estado de Sonora” presentada por Marielena Clark Rivera, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Biociencias con Especialidad en Biociencias Moleculares.



Dra. Ángela Corina Hayano Kanashiro
Directora



Dra. Kadiya del Carmen Calderón Alvarado
Co-Directora/Secretario



Dr. Ramiro Vílchez Vargas
Sinodal externo



Dr. Luis Ángel Medina Juárez
Sinodal interno



Dr. Luis Fernando García Ortega
Sinodal externo

DEDICATORIA

A mis padres: Maricela Rivera Buelna y Oscar Enrique Clark Cabrera, que han sido la fuerza mas grande de mi vida.

A mis hermanos, Oscar Enrique y Yara Aileen Clark Rivera.

Gracias por todo.

Que el futuro diga la verdad y evalúe a cada uno según su trabajo y logros. El presente es de ellos; El futuro, para el que realmente he trabajado, es mío.

Nikola Tesla

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT) del cual fui beneficiaria (637576), dentro del proyecto “Estudio de la dinámica microbiana edáfica asociada al chiltepín silvestre (*Capsicum annuum L. var. glabriusculum*) en 4 municipios del estado de Sonora” con clave USO313003182, dentro del Programa de Posgrado en Biociencias, en el Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora.

A la **Dra. Ángela Corina Hayano Kanashiro**, por su integridad, paciencia y confianza brindada.

A todos lo que integran mi comité de tesis, **Dra. Kadiya Calderon Alvarado, Dr. Luis Ángel Medina Juárez, Dr. Ramiro Vilchez Vargas y Dr. Luis Fernando García Ortega** por el asesoramiento y tiempo brindado.

A la **Dra. Laura Mondragón Camarillo** y el **Dr. Salvador Rodríguez Zaragoza** de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. A la **Dra. Lina Raquel Riego** del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica y al **Dr. Sergio De los Santos Villalobos** del Instituto Tecnológico de Sonora, por su apoyo en la realización y desarrollo de mi tema de tesis.

A mis compañeros de laboratorio, que sin ellos no estaría culminando este momento: **Damaristelma De Jesús, Amairani Moreno, Pablo Lovio, Karla Yescas, Yeimi Vegas, Luz A. Burruel, Enrique Martínez y en especial a Fernando Razo**, por su gran ayuda y guía en cada paso dado. ¡¡¡GRACIAS A TODOS!!!

Busquemos el eliminar todas las barreras en el camino de la ciencia.

RESUMEN

El chiltepín (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) es una especie silvestre, progenitor de los chiles cultivados con gran valor genético, biológico y comercial. Es de gran importancia sociocultural en el estado de Sonora ya que se usa principalmente como especia en la preparación de alimentos. La composición de la microbiota del suelo asociada a la planta de chiltepín no es bien conocida hasta el momento; siendo ésta fundamental en los procesos de los ecosistemas; por lo que el objetivo de este trabajo es analizar las comunidades bacterianas e identificar las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) asociadas al chiltepín silvestre y cultivado; además de observar y analizar si existen diferencias de la microbiota entre zonas geográficas donde crece el chiltepín y la época del año. Para ello, se realizó un muestreo durante tres estaciones del año 2017: seca, lluvia y post-lluvia en cuatro municipios del estado de Sonora. Asimismo, para conocer la actividad microbiana de las comunidades presentes en cada época evaluada se realizó el análisis de los parámetros fisicoquímicos del suelo como: pH, humedad y cuantificación de nitrógeno inorgánico. Además, se realizó la caracterización metabólica bacteriana, seleccionando 14 cepas que presentaron actividad en tres parámetros evaluados: 1-) producción de ácido indol acético, 2-) solubilización de fosfatos y 3-) producción de sideróforos. La Identificación taxonómica de BPCV se realizó mediante la secuenciación del gen 16S rRNA. Para determinar su identidad se realizó el posterior análisis bioinformática, el cual consistió en la edición de las secuencias utilizando Chromas y BLAST (Altschul *et al.*, 1997); resultando en la identificación de BPCV que constituyen un grupo central, las cuales no difieren del lugar y época del año. Esta cepa identificada pertenece a la especie *Bacillus velezensis*.

ABSTRACT

Chiltepin (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) is a wild species, a progenitor of the cultivated chili peppers with great genetic, biological and commercial value. It is of grand socio-cultural importance in the state of Sonora since is mainly used as a spice in food preparation. The composition of the soil microbiota associated with the chiltepin plant is not well known so far; being this fundamental in the ecosystem processes. Therefore, the aim of this study is to analyze bacterial communities and identify plant growth-promoting bacteria (PGPB) associated with wild and cultivated chiltepin. Besides observing and analyzing whether there are differences in the microbiota between geographical areas where chiltepin grows and the season of the year. Sampling was carried out during three seasons of 2017: dry, rain and post-rain, in four municipalities of the state of Sonora. Moreover, in order to know the microbial activity of the communities present in each season, the analysis of the physicochemical parameters of the soil was carried out, such as pH, humidity and quantification of inorganic nitrogen. In addition, bacterial metabolic characterization was performed, selecting 14 strains that activity in three parameters tested: 1-) indole acetic acid production, 2-) phosphate solubilization and 3-) siderophore production. PGPB identification was performed by sequencing the 16S rRNA gene. To determine their identity, bioinformatic analysis was performed using the Chromas and BLAST programs; resulting in the identification of PGPB that we can establish as a core group, which do not differ from the place and season of the year. This identified strain belongs to the species *Bacillus velezensis* FZB42; which covers 50% of the PGPB data.

INDICE GENERAL

	Página
APROBACIÓN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xii
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	5
I.1 Género <i>Capsicum</i>	5
I.2 <i>Capsicum annuum</i>	5
I.3 Chiltepín (<i>Capsicum annuum</i> L. var. <i>glabriusculum</i>)	6
I.4 Taxonomía del Chiltepín	6
I.5 Morfología del Chiltepín	7
I.6 Compuestos Fitoquímicos	8
I.7 Importancia Económica del Chiltepín en Sonora, México	10
I.8 Ecología del Chiltepín	11
I.8.1 Distribución geográfica del chiltepín	11
I.9 Interacción Planta-microorganismo en Suelo	12
I.10 Ciclos Biogeoquímicos	13
I.10.1 Nitrógeno	14
I.10.2 Nitrógeno inorgánico	15
I.10.3 Mineralización de nitrógeno	16
I.11 Microorganismos Rizosféricos	17
I.12 Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV)	18
I.12.1 Propiedades promotoras del crecimiento vegetal	18
I.12.1.1 Producción de sideróforos	19
I.12.1.2 Solubilización de fósforo	19
I.12.2 Fitohormonas del crecimiento vegetal	20
I.12.3 Auxinas	20
I.13 Fijación de Nitrogeno	22
I.14 Compuestos Volátiles	23
I.15 Control Biológico	23
I.16 Biosíntesis de Compuestos Antimicrobianos	24
I.17 Resistencia Sistémica Inducida	24
II. JUSTIFICACIÓN	25
III. HIPÓTESIS	26
IV. OBJETIVOS	27
IV.1 Objetivo General	27
IV.2 Objetivos Específicos	27
V. METODOLOGÍA	28
V.1 Área de Estudio	28

V.2	Zonas Muestreadas	29
	V.2.1 Municipio de Hermosillo; localidad de San Pedro El Saucito ...	29
	V.2.2 Municipio de Moctezuma, Rancho La Montosa	30
	V.2.3 Municipio de Banámichi, Rancho La Mora	32
	V.2.4 Municipio de Opodepe, localidad Merésichic	33
V.3	Metodología de Muestreo	35
V.4	Análisis Físico-químico del Suelo	36
	V.4.1 Medición de pH del suelo	36
V.5	Humedad	36
	V.5.1 Método gravimétrico	36
V.6	Reserva de Nitrógeno Inorgánico en Suelo	37
	V.6.1 Determinación de amonio	37
	V.6.2 Determinación de nitrito	39
	V.6.3 Determinación de nitrato	40
V.7	Determinación de Microorganismos Cultivables	41
	V.7.1 Asilamiento	41
	V.7.2 Selección de cepas bacterianas de interés	42
V.8	Evaluación <i>in vitro</i> de Propiedades Promotoras del Crecimiento Vegetal de Aislamientos Provenientes del Suelo	42
	V.8.1 Determinación de la capacidad de solubilización de fosfato inorgánico	42
	V.8.2 Determinación de producción de sideróforos	44
	V.8.3 Determinación de la capacidad de producir ácido indol acético (AIA)	45
V.9	Extracción de ADN de Bacterias Aisladas	45
	V.9.1 Cuantificación e integridad del ADN bacteriano	46
	V.9.2 Amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	46
	V.9.3 Determinación de los parámetros de PCR	47
	V.9.4 Condiciones de reacción de PCR	47
V.10	Preparación de las Muestras para el Envío a Secuenciación tipo Sanger del Gen 16SrRNA	49
V.11	Análisis Filogenético Molecular.	50
V.12	Análisis Estadístico	50
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	52
	VI.1 Análisis Físico-químico del Suelo	52
	VI.2 Temperatura	53
	VI.3 Conductividad Eléctrica (dS/m)	54
	VI.4 Humedad	56
	VI.5 pH	57
	VI.6 Nitrógeno Inorgánico en Suelo	58
	VI.7 Amonio	59
	VI.8 Nitrito	60
	VI.9 Nitrato	61
	VI.10 Bacterias Cultivables	63

VI.11	Correlación de los Análisis Físico-químico del Suelo con Respecto a la Temporada y Ubicación de Muestreo	64
VI.12	Aislamiento y Caracterización Metabólica de Bacterias	66
VI.12.1	Evaluación <i>in vitro</i> de propiedades promotoras del crecimiento vegetal	71
VI.12.2	Solubilización de fósforo	71
VI.12.3	Producción de sideróforos	73
VI.12.4	Determinación de la capacidad de producir ácido indolacético (AIA)	76
VI.12.5	Análisis de las 37 cepas aisladas en base a los tres mecanismos promotores de crecimiento vegetal (producción de sideróforos, solubilización de fosfato y producción de ácido indol acético)	77
VI.13	Correlación entre los Tres Mecanismos Promotores del Crecimiento Vegetal Evaluados (Producción de Sideróforos, Solubilización de Fosfato y Producción de Ácido Indol Acético)	79
VI.14	Extracción de ADN Bacteriano	81
VI.14.1	Cuantificación de ADN bacteriano	81
VI.14.2	Amplificación del gen 16S rDNA, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	82
VI.14.3	Purificación de los productos de PCR del gen 16S rDNA a partir de las cepas seleccionadas utilizando el Kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN TM)	83
VI.15	Envío de los Productos de PCR a Secuenciación	84
VI.15.1	Resultados de la secuenciación de los productos de PCR	84
VI.15.2	Identificación por medio del gen 16S rDNA de las cepas seleccionadas de la rizósfera del chiltepín (<i>Capsicum annuum</i> L. var. <i>glabriusculum</i>)	84
VI.15.3	Árbol Filogenético	87
VII.	CONCLUSIONES	91
VIII.	RECOMENDACIONES	93
IX.	LITERATURA CITADA	94
	APENDICES	
	Anexo 1	109
	Anexo 2	111

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	A) Flor de chiltepín , B) Fruto de chiltepín (inmaduro) y C) Fruto de chiltepín (maduro).	8
2	Fotografía de mezquite asociado a la planta de chiltepín como planta nodriza.	12
3	Interfaz raíz-suelo, interacción de las bacterias con la rizosfera y la endosfera. Imagen tomada de Bulgarelli <i>et al.</i> , 2013.	13
4	Ciclo del nitrógeno, imagen tomada de Johann Dréo, 2015.	15
5	Las vías de biosíntesis de auxina propuestas en bacterias. Imagen tomada de Di <i>et al.</i> , 2015. Adaptación de Spaepen <i>et al.</i> , 2007 y Patten <i>et al.</i> , 2013 modificada por Di <i>et al.</i> , 2015. Se indican las enzimas y los metabolitos intermedios involucrados en estas vías.	21
6	Localización geográfica de los municipios donde se realizaron los muestreos en el Estado de Sonora, México, 2019. Realizado en Arcmap.	29
7	Cultivo de chiltepín en casa sombra, localidad de San Pedro El Saucito en el Municipio de Hermosillo, Sonora, México.	30
8	Municipio de Moctezuma, Rancho La Montosa.	31
9	Municipio de Banámichi, Rancho La Mora.	33
10	Municipio de Opodepe, localidad Merésichic.	35
11	Diagrama de toma de muestras de suelo en cada municipio de interés.	36
12	Determinación de temperatura del suelo en 4 municipios del estado de Sonora en 3 diferentes épocas del año (seca, lluvia y post-lluvia). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) prueba Tukey.	54
13	Determinación de conductividad eléctrica del suelo en 4 municipios del Estado de Sonora en 3 diferentes épocas del año (seca, lluvia y post-lluvia). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) prueba Tukey.	55
14	Determinación de humedad del suelo en 4 municipios del Estado de Sonora en 3 diferentes épocas del año. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) prueba Tukey. Cada valor representa tres repeticiones en cada sitio de muestreo.	56
15	Determinación de pH del suelo en 4 municipios del Estado de Sonora en 3 diferentes épocas del año (seca, lluvia y post-lluvia). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) prueba Tukey.	58
16	Determinación de Amonio del suelo en 4 municipios del Estado de Sonora en 3 diferentes épocas del año (seca, lluvia y post-lluvia). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) prueba Tukey.	60
17	Determinación de Nitrito del suelo en 4 municipios del Estado de Sonora en 3 diferentes épocas del año (seca, lluvia y post-lluvia). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) prueba Tukey.	61
18	Determinación de Nitrateo del suelo en 4 municipios del Estado de Sonora en 3 diferentes épocas del año (seca, lluvia y post-lluvia). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) prueba Tukey.	62

19	Unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de suelo de población de bacterias rizosféricas, durante las diferentes épocas del año en cuatro municipios de Sonora. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) prueba Tukey. Cada valor representa tres repeticiones en cada sitio de muestreo.	64
20	Análisis de componentes principales (PCA), entre factores ambientales, ubicación y estaciones del año presentes en el suelo de la rizosfera de chiltepin.	65
21	Halo de solubilización de fosfatos producido por la cepa 4BAN2A correspondiente al municipio de Banámichi durante la época de lluvia.	71
22	Determinación del índice de eficiencia de solubilización de fosfato en 37 bacterias aisladas.	72
23	Halo alrededor de la colonia indica que la bacteria produce sideróforos. Cepa 10OP3B correspondiente al municipio de Opodepe durante la época de post-lluvia.	75
24	Valores de producción de sideróforos en las cepas aisladas en el presente estudio.	75
25	Valores de producción de ácido indol acético en las cepas aisladas en el presente estudio.	77
26	Análisis de componentes principales (PCA), de aislamientos bacterianos.	80
27	Electroforesis en gel de agarosa al 1% con muestras de ADN que fueron extraídas usando el protocolo modificado de Bergallo <i>et al.</i> (2006). (A) Carril M: Marcador de peso molecular 1Kb. Carril 1 al 8: 1SP2C, 3SP2A, 1BAN3A, 4SP3A, 2OP2C, 3OP2C, 4OP2B y 10OP3B. (B) Carril M: Marcador de peso molecular 1Kb. Carril 9 al 14: 3MOC2A, 2SP3A, 19BAN3C, 4BAN2A, 10MOC2B y 12MOC2B.	81
28	Electroforesis en gel de agarosa al 1% con productos de PCR obtenidos de la amplificación del gen 16S rRNA. (A) Carril M: Marcador de peso molecular 1Kb. Carril 1 al 9: 1SP2C, 3SP2A, 2SP3A, 4SP3A, 2OP2C, 3OP2C, 4OP2B, 10OP3B y 4BAN2A. Carril C- : Control negativo. (B) Carril M: Marcador de peso molecular 1Kb. Carril 10 al 14: 1BAN3A, 19BAN3C, 3MOC2A, 10MOC2B y 12MOC2B.	82
29	Electroforesis en gel de agarosa al 1% con productos de PCR de bacterias seleccionadas para su identificación. A) Carril M: Marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 1 al 8: 1SP1A, 1SP2C, 3SP2A, 4SP2A, 2SP3A, 3SP3A, 4SP3A, 1OP2B. B) Carril M: Marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 9 al 17: 2OP2C, 3OP2C, 4OP2B, 28OP2A, 32OP2D, 10OP3B, 19OP3B, 4BAN2A, 7BAN2B. B) Carril M: Marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 18 al 22: 1BAN3A, 19BAN3C, 3MOC2A, 10MOC2B, 12MOC2B.	83
30	Ejemplo de electroferograma de un producto de PCR generado y visualizado en el programa Chromas (Treves, 2010).	84
31	Género de bacterias identificadas de acuerdo al municipio.	85
32	Análisis filogenético basado en las secuencias parciales del 16S rRNA obtenidas de las 14 bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el que se muestran los valores Bootstrap (1000 ejecuciones replicadas). Los	88

números de las accesiones GenBank son listados antes del nombre de las especies. *Jateophihabitans* soil strain KIS75-12 fue utilizada como grupo externo.

Anexo 2

A1	Curva patrón de ácido indol acético (AIA), a diferentes concentraciones de un estándar de ácido indolacético.	115
----	---	-----

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Clasificación taxonómica del chiltepín	6
2	Diferentes nombres dado para chiltepín (González-Jara <i>et al.</i> , 2011; Pickersgill, 1971; Eshbaugh, 1975)	7
3	Producción y costos del chiltepín (Cassio <i>et al.</i> , 2006; Robles <i>et al.</i> , 2015)	11
4	Preparación de Sales Pikovskaya 10x: 500 ml	43
5	Preparación de azul de bromofenol 100x	43
6	Oligos del gen 16S rRNA utilizados como cebadores para la amplificación por PCR a una amplia gama de bacterias. pb = Pares de bases. Ta = Temperatura de alineación.	46
7	Estandarización del programa para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	47
8	Cantidades utilizadas para la preparación de la reacción de PCR. Cada reacción se llevó acabo con un volumen total de 50 µl. dH ₂ O= Agua destilada libre de nucleasas.	48
9	Programa utilizado de Touchdown PCR para dos cepas aisladas en el presente estudio.	48
10	Determinación de pH, humedad, temperatura, conductividad eléctrica y unidades formadores de colonia para bacterias, asociados al suelo del chiltepín de 4 municipios del Estado de Sonora en tres épocas del año (seca, lluvia y post-lluvia).	52
11	Descripción fenotípica macroscópica de las UFC de 37 aislados bacterianos de interés.	66
12	Resultado de los tres mecanismos promotores del crecimiento vegetal (producción de sideróforos, solubilización de fosfato y producción de ácido indol acético) que se realizaron a las 37 cepas bacterianas con posibles propiedades promotoras del crecimiento vegetal.	78
13	Determinación filogenética de 14 bacterias encontradas prevalentes en la rizosfera asociada a <i>Capsicum annuum L. var. glabriusculum</i> , basadas en la secuencia parcial del gen 16S rRNA.	86
Anexos		
A1. T1	Lista de reactivos para Preparación de “Solución 2”.	109
A1. T2	Lista de reactivos para Preparación de “Solución 3”.	110
A2. T3	Ubicación de coordenadas de muestreo realizado en cuatro localidades pertenecientes a cuatro municipios del estado de Sonora.	111
A2. T4	Características microscópicas y macroscópicas de las cepas bacterianas de interés.	113
A2. T5	Bacterias identificadas promotoras del crecimiento vegetal con sus respectivas determinaciones de producción de ácido indolacético, solubilización de fosfato y producción de sideróforos.	116

INTRODUCCIÓN

México se caracteriza por ser el centro de domesticación del chile y posee una gran diversidad de este fruto (Kraft *et al.*, 2014). El chile pertenece al género *Capsicum* de la familia de las Solanáceas. Este género, incluye alrededor de 36 especies conocidas, de las cuales cinco especies son consideradas como las principales: *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. baccatum*, *C. pubescens* y *C. chinense* (Bosland *et al.*, 2000; Russo, 2012; Hayano-Kanashiro *et al.*, 2016). Normalmente, son cultivados en cosechas anuales, cuya producción global es de aproximadamente 360,92,631 toneladas (FAO 2018), aumentando cada año.

La especie *Capsicum annuum* es la más utilizada y reconocida de todas, debido a su extensión de cultivo, esta especie, posee tres variedades distintivas: *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* (chiltepín), *Capsicum annuum* var. *annuum* (pimiento morrón) y *Capsicum annuum* var. *bola*. Se sabe que el chiltepín es el progenitor silvestre de *C. annuum* var. *annuum* (Aguilar-Meléndez *et al.*, 2009; González-Jara *et al.*, 2011) lo que lo distingue de los chiles cultivados. Por lo tanto, es considerado un importante recurso genético para el mejoramiento de los cultivos de chile. Esta consideración se debe al descubrimiento de poblaciones silvestres de *Capsicum annuum* provenientes del noroeste de México que presentaron resistencia a patógenos como, por ejemplo; al virus Huasteco de la Vena Amarilla del Chile (PHYVV) (Hernández-Verdugo *et al.*, 2001; González-Jara *et al.*, 2011).

Existe una creciente demanda cada año, por buscar alternativas que mejoren el rendimiento de este importante cultivo, en el cual se destaca la aplicación de herbicidas, pesticidas y fertilizantes. Lo que desencadena una gran preocupación ambiental y de salud (Cassman *et al.*, 2002, Cameron *et al.*, 2013). Uno de los factores que influyen en el rendimiento de los cultivos es la rizósfera de las plantas. Las plantas terrestres están colonizadas por diversos microorganismos que afectan la salud y el crecimiento de las plantas de una manera beneficiosa, dañina o neutral. Estas interacciones (planta-microorganismo) ocurren en la rizósfera (Müller *et al.*, 2016).

La rizósfera es uno de los ecosistemas más complejos de la tierra, comprende una zona de suelo rica en nutrientes y está influenciada por las raíces de las plantas. Está habitado por diversos microorganismos, incluidos nemátodos, hongos, bacterias y artrópodos (Venturi *et al.*,

2016; Khenaka *et al.*, 2019). La rizósfera está asociada con una mayor abundancia y actividad bacteriana, pero con una menor diversidad de estas comunidades bacterianas. Se sabe que las plantas son selectivas en la comunidad microbiana que se encuentra en la rizósfera y en estudios anteriores, enfocados en su comunidad, han revelado comunidades microbianas diferenciales asociadas con diferentes especies de plantas (Mhlongo *et al.*, 2018). El ambiente de la rizósfera difiere del de los tejidos vegetales internos de la planta; entre esas diferencias se encuentran la interacción de los factores abióticos, tales como, la temperatura, la emisión de luz, el tipo de suelo, el pH, la competencia de los nutrientes y la interacción con otros organismos. Estos factores son clave en el desarrollo de diferentes estrategias para la interacción de las bacterias y la planta en la rizósfera (Calderón *et al.*, 2019; Santoyo *et al.*, 2019). Las bacterias que colonizan las raíces de las plantas en una relación simbiótica se les denomina rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) cuyo papel es contribuir a la nutrición y protección de las plantas. Esta actividad la realizan a través de diversos procesos, como la producción y secreción de varios metabolitos secundarios en la rizósfera que ejercen efectos positivos en el desarrollo de las plantas, principalmente son estudiadas en su utilización en cultivos de interés comercial como el arroz, el trigo, el maíz, algodón y pimienta negra (Khalid *et al.*, 2004; Anjum *et al.*, 2007; Sandhya *et al.*, 2010; Dastager *et al.*, 2010; Maleki *et al.*, 2010). Sin embargo, muy pocos estudios han aislado y caracterizado las BPCV asociados al Chile en general y no existe estudio realizado en específico en el chiltepín.

Los efectos positivos que provocan estas bacterias sobre las plantas se deben a la síntesis de fitohormonas y a la fijación biológica de nitrógeno molecular (N₂) (Corrales *et al.*, 2017; Khenaka *et al.*, 2019). El crecimiento de plantas mediado por BPCV facilitan la absorción de nutrientes y se ha documentado su utilización como biofertilizante para el reemplazo de los métodos existentes de control de plagas (pesticidas, herbicidas y fungicidas) y así aumentar el rendimiento de los cultivos (Zafar *et al.*, 2012; de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013; Vejanet *et al.*, 2016; Ji *et al.*, 2019).

La pérdida de biodiversidad microbiana es ahora reconocida como una de las principales amenazas a las que se enfrentan los suelos, lo que puede alterar el funcionamiento y la estabilidad del ecosistema; recientemente, los microorganismos del suelo se han vuelto de interés en la ecología de la restauración, ya que estos pueden ser utilizados para restablecer la

biodiversidad y las funciones en ecosistemas degradados. Sin embargo, nuestra comprensión del papel de las interacciones de las especies y de los efectos en la trayectoria de restauración de la biodiversidad microbiana y su funcionamiento es limitada a pesar de ser crucial (Calderón *et al.*, 2016). El metabolismo y la supervivencia de los microorganismos están fuertemente influenciados por la disponibilidad de agua y nutrientes, las superficies de los entornos del suelo sufren cambios cíclicos dramáticos en el contenido de agua, que van desde la saturación del agua hasta la extrema aridez. Estos cambios, aunados a otros factores ambientales como los cambios de pH, disponibilidad de oxígeno y temperatura, alteran las poblaciones microbianas (Daniel *et al.*, 2005; Bulgarelli *et al.*, 2013; Müller *et al.*, 2016; Calderón *et al.*, 2019). Mejorar el conocimiento entre la conexión planta-microbioma en la rizósfera será fundamental en el manejo de la biodiversidad del suelo y una producción sostenible de plantas (Rillig *et al.*, 2018).

Aún falta conocer la mayor parte de la diversidad de microorganismos del planeta; La aplicación de técnicas de biología molecular representa un gran avance en el conocimiento de estos ecosistemas. El análisis molecular de las bacterias aisladas y la identificación de BPCV mediante el análisis bioinformático de lecturas generadas por secuenciación del gen 16S rRNA en conjunto con otras técnicas, nos ayuda a comprender la interacción bacteriana general entre poblaciones de chiltepín silvestre y cultivado.

El presente estudio es de suma importancia ya que las plantas de chiltepín silvestre que se encuentran en el norte de México, específicamente en el estado de Sonora presentan un riesgo creciente de disminución de sus poblaciones locales. En las últimas décadas el cultivo de chiltepín ha progresado a monocultivos en pequeños campos tradicionales, posiblemente como resultado de la creciente demanda y recesión de su población silvestre. Por lo que, se deben implementar medidas de conservación de las poblaciones silvestres del chiltepín para mantener la fuente genética de este importante cultivo (Rodríguez, *et al.*, 2005).

Se sugiere la utilización de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, mejorar el conocimiento sobre las asociaciones de plantas y microbios en la rizósfera será un paso crucial hacia el manejo racional de la biodiversidad del suelo y el progreso sostenible en la producción y el rendimiento de las plantas (Rillig *et al.*, 2018).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue el de identificar las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) utilizando análisis moleculares e identificación taxonómica mediante la extracción de ADN genómico de las bacterias aisladas de interés, identificándolas por secuenciación del gen 16S rRNA asociadas al chiltepín silvestre y cultivado (*C. annuum* L. *var. glabriusculum*) según su ubicación geográfica en el Estado de Sonora y época del año.

I. ANTECEDENTES

I.1. Género *Capsicum*

El género *Capsicum* es miembro de la familia *Solanaceae* y es una de las más importantes para los seres humanos. La familia es de tamaño mediano, con aproximadamente 90 géneros y 3000–4000 especies, con una sorprendente variación en muchos caracteres tanto de flores como de frutos (Knapp *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2014). Las especies de *Capsicum* son pequeñas hierbas perennes nativas de América del Sur tropical. Los 5 géneros más comunes son: *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. frutescens*, *C. chinense* y *C. pubescens*, que se cree que son el resultado de la domesticación hace 6000 años por los nativos americanos. (A Omolo, 2014; Qin *et al.*, 2014; Perry *et al.*, 2007). Engloba a todas las formas de pimiento, ají o chile cultivadas actualmente (Viñals *et al.*, 1996).

El género *Capsicum* incluye aproximadamente 32 especies nativas de América tropical con una gran diversidad de formas, tamaños y colores de frutos (Zeng *et al.*, 2014; Moscone *et al.*, 2007).

I.2. *Capsicum annuum*

Las zonas de domesticación y patrones de dispersión de estas especies siguen siendo especulativos. Una combinación de evidencia arqueológica, análisis genéticos y distribuciones modernas de plantas han llevado a los investigadores a sugerir que *C. annuum* se domesticó inicialmente en México o en el norte de América Central, *C. frutescens* en el Caribe, *C. baccatum* en las tierras bajas de Bolivia, *C. chinense* en la Amazonia de tierras bajas del norte y *C. pubescens* en la cordillera de los Andes (Perry *et al.*, 2007). La terminología utilizada para designar a los miembros del género *Capsicum* es confusa ya que según la región se les puede llamar de distinta forma, de hecho, existen más de 200 nombres comunes para esta especie, entre ellos, chile, chili, paprika, ají, cayena, chiltepín, etc. (Zhigila *et al.*, 2014).

I.3. Chiltepín (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*)

El nombre científico utilizado para chiltepin es *C. annuum* L. var. *glabriusculum* (Dunal) Heiser y Pickersgill (Heiser y Pickersgill, 1975; Wiersema y León, 1999). En cuanto al nombre común del chiltepín; también se encuentra de diferentes formas: chilepiquín, chiltepec, chiltepillito, chilpaya, chile de monte y chile parado (entre otras) dependientes de la región de México en la que te encuentres (Araiza-Lizarde *et al.*, 2011).

I.4. Taxonomía del Chiltepín

La taxonomía dentro del género *Capsicum* es compleja debido a la gran variabilidad de formas existentes en las especies cultivadas y a la diversidad de criterios utilizados en la clasificación (Viñals *et al.*, 1996). Durante muchos años ha estado en confusión y se han descrito varias especies silvestres, pero para alcanzar y comprender su taxonomía y relaciones, se ha considerado el estado actual del conocimiento de las especies domesticadas, principalmente la morfología floral, genética y la bioquímica (Eshbaugh, 1975).

En la Tabla 1, se muestra la especie y variedad a la que pertenece el chiltepín, en la Tabla 2 se observa los diferentes nombres que se le dieron a la variedad, utilizando actualmente la denominada por (Dunal) Heiser y Pickersgill (1975).

Tabla 1. Clasificación taxonómica del chiltepín.

Taxonomía	
Orden	<i>Solanales</i>
Familia	<i>Solanaceae</i>
Género	<i>Capsicum</i>
Especie	<i>Capsicum annuum</i>
Variedad	<i>Capsicum annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>

Tabla 2. Diferentes nombres dado para chiltepín (González-Jara *et al.*, 2011; Pickersgill, 1971; Eshbaugh, 1975).

Nombre Científico	Autor
<i>Capsicum annuum</i> L. var. <i>minus</i>	Fingerhuth (1832)
<i>Capsicum annuum</i> L. var. <i>baccatum</i>	Terpó (1966)
<i>Capsicum annuum</i> L. var. <i>minimum</i>	Heiser y Pickersgill (1964)
<i>Capsicum annuum</i> var. <i>aviculare</i>	D'Arcy y Eshbaugh (1973)
<i>Capsicum annuum</i> L. var. <i>glabriusculum</i>	(Dunal) Heiser y Pickersgill (1975)

I.5 Morfología del Chiltepín

El chiltepín se caracteriza por una alta variedad fenotípica, cuenta con una gran cantidad de rasgos como la morfología de las hojas y el patrón de germinación de las semillas (González-Jara *et al.*, 2011; Hayano-Kanashiro *et al.*, 2016).

El chiltepín es un arbusto perenne altamente ramificado con tallos delgados que a menudo trepan otros arbustos y pueden alcanzar alturas de hasta dos metros; el fruto es una baya redonda u oblicua de 3 a 6 mm de diámetro que crece en posición eréctil. Existe una gran variabilidad de formas de frutos, que pueden ser redondos, ovalados, cónicos y alargados, pero todos son pequeños, de diferentes tonos, desde verde en estado inmaduro hasta color rojo intenso y brillante al madurar (Figura 1) (Pozo *et al.*, 2003). Las plantas de chiltepín alcanzan su madurez reproductiva entre los 6 y 10 meses de edad y su floración comienza durante los meses de julio, durando aproximadamente hasta septiembre, y la fructificación es de septiembre a octubre (González *et al.*, 2011; Hayano-Kanashiro *et al.*, 2016). Esta planta crece en suelos profundos con vegetación perenne densa, en regiones xerófilas en el desierto de Sonora o en la meseta central, donde comúnmente se asocia con árboles nodriza (González *et al.*, 2011). Estos árboles nodriza proporcionan al chiltepín sombra, humedad, mayor fertilidad del suelo y lo protegen del pastoreo y el pisoteo (Hayano-Kanashiro *et al.*, 2016).



Figura 1. A) Flor de chiltepín, B) Fruto de chiltepín (inmaduro) y C) Fruto de chiltepín (maduro)

El chiltepín es de gran importancia cultural y comercial, este se utiliza como condimento en la preparación de comidas, producen y acumulan compuestos conocidos como capsaicinoides (Rochín-Wong *et al.*, 2013), que son responsables del característico sabor picante de los frutos. Los capsaicinoides son un grupo de amidas ácidas derivadas de la vanililamida (Quijano *et al.*, 2009). Esta capacidad para acumular capsaicinoides determina el grado de pungencia asociado con *Capsicum* spp. En México, el chiltepín se considera el segundo chile más picante con 100,000 a 200,000 SHU (unidades Scoville; SHU, del inglés Scoville Heat Units), después del chile habanero (*C. chinense*, 100,000 a 445,000 SHU), pero algunas variedades de *C. annum* también pueden alcanzar niveles similares de pungencia, dependiendo de las condiciones de cultivo. Los capsaicinoides poseen propiedades antioxidantes. El chiltepín es también una fuente de otros fitoquímicos antioxidantes, tales como compuestos fenólicos, carotenoides, tocoferoles, tocotrienoles y vitamina C (Hayano-Kanashiro *et al.*, 2016).

I.6 Compuestos Fitoquímicos

Los frutos frescos de *Capsicum* spp. son una excelente fuente de vitaminas A, E y C, así como compuestos fenólicos neutros y ácidos, los cuales son antioxidantes importantes (Howard *et al.*, 2000), debido a su contenido de capsaicina tienen un papel importante con fines farmacológicos y actualmente se utiliza para diferentes fines terapéuticos como reducción o prevención de enfermedades degenerativas crónicas y cáncer, por los efectos anticancerígenos, analgésicos, antiartríticos, antioxidantes y antiinflamatorios que se han asociado con el contenido de

capsaicina en el fruto del chile (Alvarez *et al.*, 2011; Ovando *et al.*, 2018; Olatunji *et al.*, 2019). El fruto de chiltepín contiene una variedad de fitoquímicos bioactivos que incluyen flavonoides, carotenoides, compuestos fenólicos y otros compuestos antioxidantes. Además de los beneficios nutricionales del fruto y su uso como aditivos alimentarios.

Entre los fitoquímicos, los polifenoles merecen una mención especial, debido a sus propiedades de captación de radicales libres y actividades biológicas *in vivo* (Marín *et al.*, 2004). Los compuestos fenólicos tienen diversas actividades biológicas, la más importante es su capacidad antioxidante. Se consideran inhibidores potentes de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad y ácidos grasos poliinsaturados, y por lo tanto pueden reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares. También tienen una mayor estabilidad que el ácido ascórbico (Serrano *et al.*, 2006; Hayano-Kanashiro *et al.*, 2016). La gran cantidad apreciable de fenoles y flavonoides en los extractos etanólicos de *Capsicum annuum L. var. glabriusculum* contribuyó a sus capacidades antioxidantes (Tundis *et al.*, 2011).

En el estudio de Forero *et al.*, (2009) abordaron la caracterización de los compuestos volátiles de *Capsicum annuum L. var. glabriusculum*, medido en dos etapas de maduración; verde y rojo, donde se identificaron 140 componentes de los cuales siete fueron los componentes principales: hexil isopentanoato, hexil 2-metilbutanoato, limoneno, hexil isohexanoato, (E)-2-hexenal, pentanoato de isopentilo y (Z)-3-hexenilo isopentanoato. Durante la maduración de la fruta, la mayoría de los compuestos volátiles disminuyeron. En general, los chiles verdes tienen mayores cantidades de ésteres, con notas de olor afrutado a diferencia de las frutas rojas. En cuanto a las diferencias en la cantidad de compuestos volátiles totales, esta fue mayor en la etapa verde en comparación con la etapa madura, pudiendo concluir que la etapa verde fu mejor en términos de sabor que la etapa roja (Forero *et al.*, 2009).

Los carotenoides son componentes esenciales que están involucrados en muchos aspectos relacionados con la fotosíntesis, como la recolección de luz, fotoprotección, fotomorfogénesis y enfriamiento no fotoquímico. El color del fruto de los chiles se puede atribuir a varios pigmentos, como clorofilas, carotenoides y flavonoides. El pimiento se considera una de las fuentes más ricas de carotenoides entre los cultivos de hortalizas (DellaPenna y Pogson, 2006; Lightbourn *et al.*, 2008; Wahyuni *et al.*, 2011; Hayano-Kanashiro *et al.*, 2016).

El chiltepin generalmente se consume en forma deshidratada, la cual es una excelente fuente de tocoferoles (vitamina E). Este proceso se lleva a cabo utilizando un método tradicional de exposición a la luz solar durante 32 horas a temperaturas que oscilan entre 34 y 40°C. Durante este proceso de secado se incrementó la cantidad de tocoferoles. La transformación del cloroplasto en cromoplastos durante la maduración del fruto en *Capsicum annum L.* está asociada con una serie de eventos, como la acumulación masiva de carotenoides y el aumento de la síntesis de α -tocoferol. Los tocoferoles se encuentran en cuatro formas: α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol y δ -tocoferol (Arango y Heise, 1998; Hayano-Kanashiro *et al.*, 2016).

Los capsaicinoides se sintetizan y se acumulan en las células epidérmicas del tejido placentario, donde se secretan en la pared celular externa y finalmente se almacenan en estructuras llamadas "ampollas" ubicadas en la superficie placentaria (Aza-González *et al.*, 2011; Hayano-Kanashiro *et al.*, 2016). Los capsaicinoides, producen la sensación organoléptica de pungencia, siendo exclusivos de este género. Existen estudios que muestran que se encuentran más de 20 capsaicinoides en los chiles (*Capsicum spp.*). Debido a su abundancia, la capsaicina y la dihidrocapsaicina se consideraron los principales capsaicinoides, mientras que los demás fueron considerados los capsaicinoides menores (Krajewska *et al.*, 1988; Bosland *et al.*, 1999; Zewdie *et al.*, 2001). Los capsaicinoides tienen varias propiedades biológicas con efectos beneficiosos para la salud humana, entre las más importantes es de la estimulación del sistema cardiovascular y su capacidad antiinflamatoria (Montoya-Ballesteros *et al.*, 2010). En la mayoría de los pimientos los capsaicinoides presenta una variación alta dependiendo del genotipo, estado de madurez, lugar de recolección y período de almacenamiento y temperatura, entre otros (Morán-Bañuelos *et al.*, 2008).

I.7 Importancia Económica del Chiltepin en Sonora, México

Debido a su alto valor comercial, en el Estado de Sonora, el chiltepin silvestre es recolectado de manera intensiva durante los meses de septiembre a noviembre y, aunque su principal uso es alimenticio, también tiene aplicaciones medicinales y ceremoniales. Entre algunos grupos indígenas de la sierra de Sonora, el chiltepin brinda identidad regional a los sonorenses, pues lo consideran símbolo de valentía, hombría, fortaleza, y coraje (Bañuelos-Flores, 2005).

En el Estado de Sonora, la mayoría del chiltepín consumido se produce de manera natural en los agostaderos, mismo que se recolecta y se vende en las mismas localidades de la serranía (Robles, 2015).

La recolección del chiltepín o *pizca* y las demás actividades que se desarrollan en torno a dicha especie, constituye una opción de ingreso para los pobladores de la región Río Sonora. De hecho, en dicha región se tienen registro de colectas por el orden de las 70 toneladas en 2006 (Cassio y Robles, 2006); de 52 toneladas en el 2010 (Robles, 2011) y de 46.7 toneladas en el 2011. Esa tendencia decreciente de la cosecha del chiltepín ha propiciado precios atractivos en el mercado derivado de una considerable reducción en la oferta (Tabla 3).

Tabla 3. Producción y costos del fruto de chiltepín (Cassio *et al.*, 2006; Robles *et al.*, 2015).

Región	Año	Precio por Kg (peso mexicano MXN)	Precio por Kg (Euros) 1EU=21.32MXN	Producción
Sonora	2006	600	28.16	70 ton
Sonora	2010	800	37.54	52 ton
Sonora	2011	1200	56.32	46.7 ton

I.8 Ecología del Chiltepín

I.8.1 Distribución geográfica del chiltepín

El chiltepín crece bajo la protección de árboles y otras plantas de mayor tamaño en sitios montañosos cercanos a márgenes de ríos, arroyos y cañones; en áreas desérticas, se encuentran cerca de cuerpos de agua y en áreas con superficies duras (Miranda-Zarazúa *et al.*, 2007; González-Jara *et al.*, 2011; Miranda-Zarazúa *et al.*, 2011). El chiltepín se encuentra en suelos aluviales, los cuales son formados por continuos acarrees de corrientes fluviales (Molina-Maldonado *et al.*, 2009). Las mayores densidades de este arbusto reportados en la región del Río Sonora se encuentran en alturas de 850 hasta 1380 msnm (Miranda-Zarazúa *et al.*, 2007; Bañuelos *et al.*, 2008; Miranda-Zarazúa *et al.*, 2011; Hayano-Kanashiro *et al.*, 2016).

Estudios previos han mostrado que, bajo las copas de los árboles, se produce una “isla de fertilidad”. Una asociación vegetal típica del desierto sonorense está representada por las "plantas nodrizas" (Bañuelos *et al.*, 2008) como el mezquite (*Prosopis* spp.) (Bañuelos *et al.*,

2008; Miranda-Zarazúa *et al.*, 2011). Es por ello que el chiltepín, encuentran condiciones favorables para su desarrollo (Figura 2).

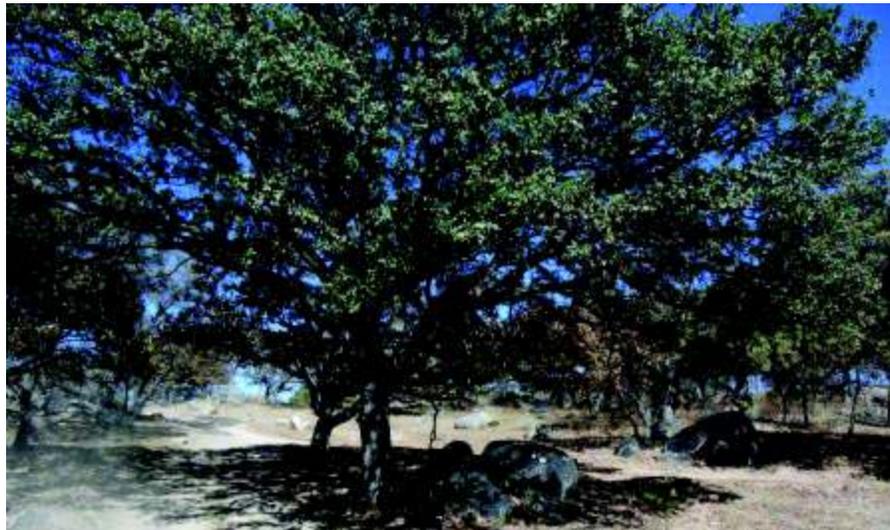


Figura 2. Fotografía de mezquite asociado a la planta de chiltepín como planta nodriza.

I.9 Interacción Planta-microorganismo en Suelo

La rizosfera es la porción del suelo que está influenciada por los exudados de la raíz (Brink, 2016) que incluyen moléculas como aminoácidos, vitaminas y azúcares, que sirven como nutrientes para las comunidades microbianas (Badri *et al.*, 2009). En este ecosistema, las bacterias están presentes en abundancia porque utilizan los nutrientes de la rizosfera y pueden interactuar y estimular el crecimiento de la planta mediante mecanismos directos o indirectos. Las raíces de las plantas se comunican con los microorganismos de una manera compleja a través de la comunicación química dentro de la rizosfera, lo que lleva a la formación de biopelículas de microorganismos beneficiosos, así como bacterias que promueven el crecimiento de las plantas (Mhlongo *et al.*, 2018).

El crecimiento y el rendimiento de las plantas en entornos naturales dependen de una gran cantidad de interacciones con bacterias y hongos (Schmidt *et al.*, 2016). Se propuso que la comunidad microbiana asociada con las raíces se ensamblara en dos pasos: primero, la rizosfera es colonizada por un subconjunto microorganismos de la comunidad del suelo total, segundo,

la rizosfera y la endosfera son colonizados por un subconjunto de la comunidad de la rizosfera (Figura 3) (Bulgarelli *et al.*, 2013; Edwards *et al.*, 2015). ha surgido un conjunto de microbios recurrentes asociados a plantas (microbioma central) (Bulgarelli *et al.*, 2013; Müller *et al.*, 2016). Debemos tener en cuenta que también existen factores específicos de ciertas plantas que resultan en una asociación con microorganismo que no son miembros del microbioma central (Sasse *et al.*, 2018).

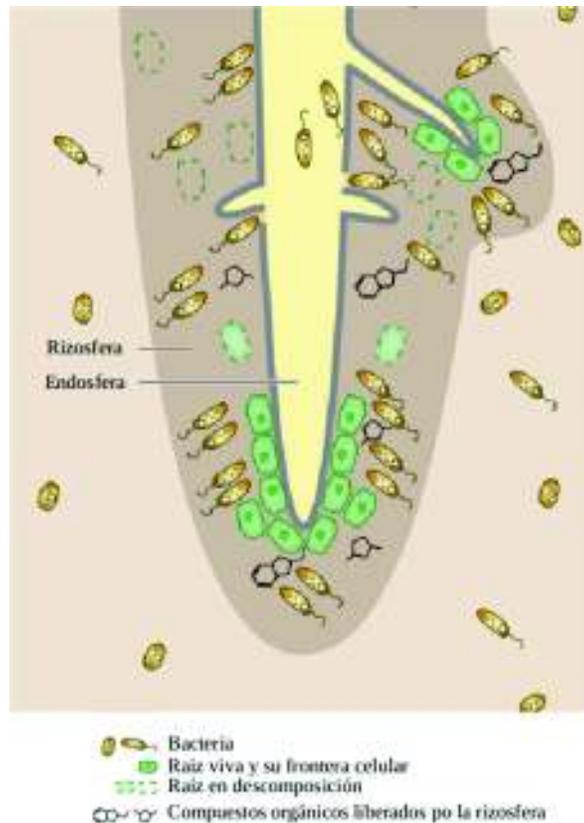


Figura 3. Interfaz raíz-suelo, interacción de las bacterias con la rizósfera y la endósfera. Imagen tomada de Bulgarelli *et al.*, 2013.

I.10 Ciclos Biogeoquímicos

La importancia de estudiar la diversidad microbiana está dada por el hecho de que estas comunidades trabajan en simbiosis con la planta por medio de ciclos biogeoquímicos muy importantes, entre éstos el ciclo del nitrógeno, que es de vital importancia ya que de éste depende el equilibrio dinámico de composición de la biosfera. La descomposición de la materia orgánica

permite reciclar nutrientes no disponibles para las plantas y volverlos a hacer disponibles, siendo los microorganismos del suelo los principales responsables de esta tarea (Celaya-Michel *et al.*, 2011).

Los flujos biológicos de carbono (C) y nitrógeno (N) son impulsados en gran medida por reacciones redox catalizadas por microorganismos utilizando los metabolitos secundarios de las bacterias (Falkowski *et al.*, 2008). Las comunidades microbianas impactan los ciclos globales de C y N (Bulgarelli *et al.*, 2013). Estos ciclos de nutrientes autoorganizados, cada vez más influenciados por las actividades humanas, pueden representarse como redes de procesos, conectando diferentes depósitos de sustancias y definiendo ciclos biogeoquímicos para diversos elementos químicos y moléculas. Debido a su metabolismo versátil, los microorganismos impulsan la mayoría de los flujos biológicos de los elementos, en particular los seis bloques de construcción principales de la vida, hidrógeno, carbono, nitrógeno, azufre, oxígeno y fósforo, y así dan forma a la biogeoquímica de nuestro planeta (Offre *et al.*, 2013).

I.10.1 Nitrógeno

El nitrógeno se considera uno de los principales nutrientes limitantes en el crecimiento de las plantas. Se ha estudiado intensamente una conversión específica en el ciclo del nitrógeno: reducción de nitrato (desnitrificación), mediante la cual el nitrato (NO_3^-) se reduce a nitrito (NO_2^-) como una vía respiratoria alternativa. El nitrito puede convertirse además en óxido nitroso (N_2O y NO) o en amoníaco (NH_4) (Figura 4). Su función es la promoción del crecimiento de las plantas que está relacionada principalmente con la utilización del NH_4 y NO_3^- . El NO es una molécula de señalización potente en las plantas, que altera el crecimiento y la proliferación de las raíces de una manera dependiente de las auxinas (Lamattina *et al.*, 2003; Bulgarelli *et al.*, 2013).

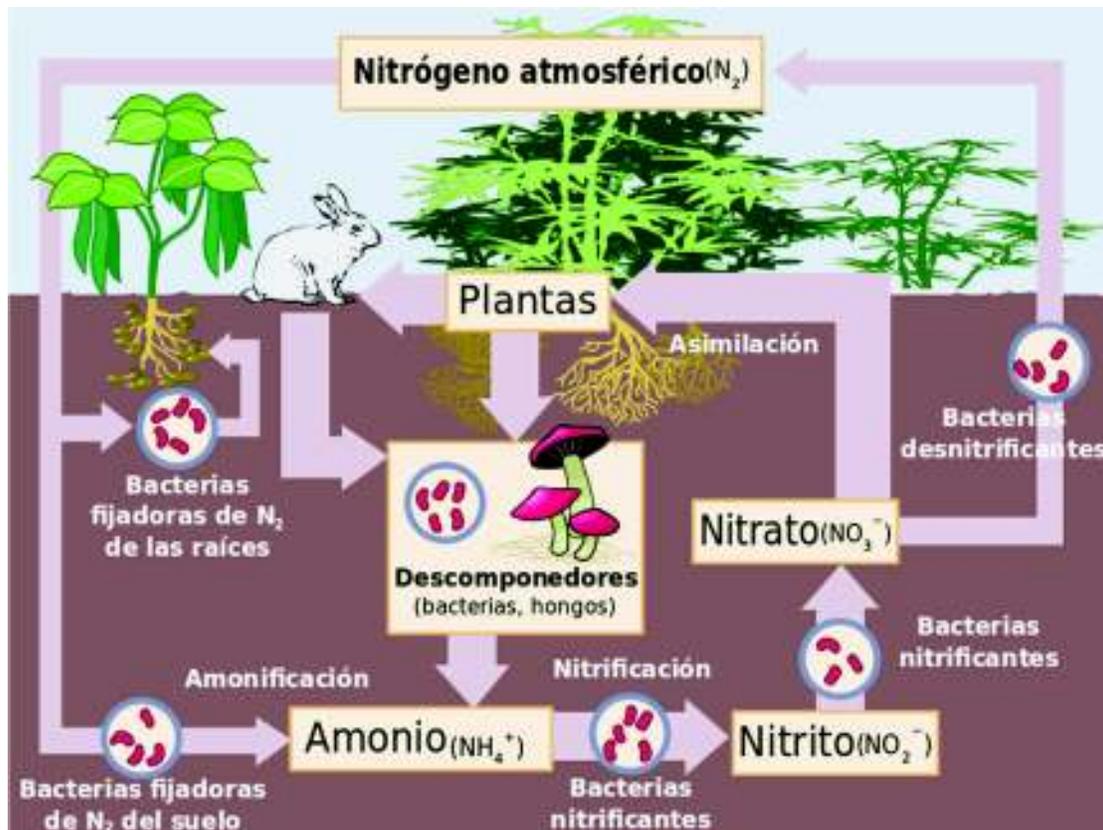


Figura 4. Ciclo del nitrógeno, imagen tomada de Johann Dréo, 2015.

I.10.2 Nitrógeno inorgánico

La mayoría de las plantas nativas de cada región están adaptadas a su ambiente y su funcionamiento óptimo va de acuerdo con las concentraciones más bajas de nitrógeno disponible en sus suelos (Vitousek *et al.*, 1997). La fijación biológica de nitrógeno con microorganismos de vida libre y simbiótica con algunas plantas representa una importante entrada de nitrógeno al suelo, lo cual cobra especial importancia en ecosistemas limitados por nitrógeno, como son las zonas áridas y semiáridas. La planta se beneficia con la asociación simbiótica y al morir, sus hojas o raíces aportan nitrógeno disponible tanto a microorganismos como a otras plantas (Celaya-Michel *et al.*, 2011). Las principales formas biológicas de nitrógeno activas para las plantas son inorgánicas: amonio y nitrato (Vitousek y Matson, 1985). En zonas áridas y semiáridas los desdoblamientos microbianos de la materia orgánica de la superficie son limitadas a breves periodos de humedad (Whitford, 2002). La fragmentación y

mineralización en ambientes mésicos ocurre de manera simultánea, mientras que en ecosistemas desérticos puede estar separada temporal y espacialmente (Celaya-Michel *et al.*, 2011).

I.10.3 Mineralización de nitrógeno

Se denomina mineralización al proceso mediante el cual el nitrógeno orgánico del suelo es transformado por los microorganismos del suelo a formas inorgánicas (amonio y nitrato; Binkley y Hart, 1989). El primer producto de la mineralización es el amoniaco (NH_3) el cual puede adquirir un hidrógeno y formar amonio (NH_4^+), que puede ser fijado por las arcillas del suelo o por la materia orgánica, volatilizado como amoniaco, asimilado por plantas o microorganismos (Philippot *et al.*, 2005). Después es reducido por bacterias autotróficas mediante el proceso de nitrificación, en donde pierde dos átomos de hidrógeno para formar nitrito (NO_2^-) y luego nitrato (NO_3^-). Parte de estas formas inorgánicas son tomadas por los microorganismos incorporándolas a su biomasa, llamado inmovilización de nutrientes (Celaya-Michel *et al.*, 2011). En zonas áridas la actividad microbiana es frecuentemente limitada por la humedad (Austin *et al.*, 2004), por lo que la tasa de mineralización e inmovilización de nitrógeno están ligadas a los pulsos de precipitación (Fisher *et al.*, 1987). Las sequías periódicas resultan en biomasa muerta de microorganismos que sirve de reservorio (Whitford, 2002) y dejan disponibles nutrientes para las plantas u otros microorganismos, por lo que la inmovilización microbiana puede reducir pérdidas de nitrógeno del ecosistema (Celaya-Michel *et al.*, 2011).

Como resultado de las condiciones ambientales en los desiertos, el nitrato es más importante como elemento presente disponible para las plantas (Schlesinger, 1997). Los microorganismos del suelo son de gran importancia al transformar compuestos orgánicos a inorgánicos disponibles para las plantas, con su actividad de descomposición y mineralización de nitrógeno. También cobra importancia en zonas áridas y semiáridas la heterogeneidad de humedad y temperatura presente bajo el dosel de árboles y arbustos en comparación con los espacios abiertos, que permite a los microorganismos bajo el dosel tener más actividad a lo largo del año (Whitford, 2002).

La temperatura y la humedad óptimas para el crecimiento bacteriano no siempre se presentan al mismo tiempo en los ecosistemas áridos y semiáridos, por lo que las tasas de

descomposición y mineralización de la materia orgánica se llevan a cabo principalmente en periodos cortos de tiempo e irregulares en el año, durante los pulsos de humedad. Los microorganismos responden rápidamente a la disponibilidad de humedad en el suelo, aun cuando solo sea un evento pequeño que solo humedezca la parte superficial, esto lleva a que el nitrógeno disponible se acumule en la época seca cuando las plantas no pueden utilizarlo (Austin *et al.*, 2004). Durante períodos de sequía, los microorganismos del suelo incorporan solutos para ajustarse osmóticamente a la ausencia de agua en el suelo, inmovilizando nutrientes disponibles en el medio (Celaya-Michel *et al.*, 2011). Cuando los periodos de sequía son muy prolongados, al humedecerse se presenta un estrés fisiológico para las comunidades microbianas superficiales y pueden inducir la ruptura de la pared celular y muerte de biomasa microbiana. Al rehumedecer, se produce un choque osmótico microbiano que induce la lisis de las células con liberación de solutos intracelulares, estos sustratos lábiles de carbono y nitrógeno pueden ser mineralizados rápidamente por los microorganismos sobrevivientes (Fierer *et al.*, 2003).

I.11 Microorganismos Rizosféricos

El suelo está repleto de formas de vida microscópicas que incluyen bacterias, hongos, actinomicetos, protozoos y algas. De estos microorganismos, las bacterias son las más abundantes (~95%). Se sabe desde hace tiempo que el suelo alberga una gran cantidad de bacterias (a menudo alrededor de 10^8 a 10^9 células por gramo de suelo) (Glick, 2012). Independientemente de la cantidad de bacterias en una muestra de suelo en particular, las bacterias pueden afectar a las plantas de una de tres maneras, la interacción entre las bacterias del suelo y las plantas puede ser (desde la perspectiva de la planta) beneficiosa, dañina o neutral (Lynch *et al.*, 1990).

La rizosfera es un entorno altamente competitivo, donde los microorganismos luchan constantemente por los recursos para sobrevivir (Sasse *et al.*, 2018). El término rizosfera fue utilizado por primera vez por Lorentz Hiltner en 1904 (Hartmann *et al.*, 2008) para describir la zona rica en nutrientes del suelo (generalmente de 1 a 3 mm alrededor de las raíces), donde los exudados de las raíces de las plantas facilitan la colonización por comunidades microbianas (Morgan *et al.*, 2005; Sasse *et al.*, 2018). Algunas de estas bacterias asociadas a la rizosfera, es

decir; las bacterias que promueven el crecimiento vegetal (BPCV), son reconocidas por su capacidad para promover la cantidad y el rendimiento de los cultivos vegetales (Beneduzi *et al.*, 2012), al producir metabolitos secundarios antimicrobianos con efecto antagonista, compitiendo por nichos y nutrientes realizando una colonización y estimulando la resistencia sistémica inducida (RSI) (Ongena *et al.*, 2008).

Los diferentes compartimientos de plantas proporcionan una multitud de nichos ecológicos diferentes para los microorganismos que los habitan. Los microorganismos se diversifican y se adaptan funcionalmente en el proceso de ocupación de tales nichos dentro de cierto hábitat en condiciones competitivas, lo que resulta en la coexistencia de poblaciones (Müller *et al.*, 2016).

I.12 Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV)

Los microorganismos que promueven el crecimiento de las plantas son principalmente organismos provenientes del suelo y de la rizosfera que pueden colonizar las raíces de las plantas en cantidades significativas (10^5 - 10^7 UFC por gramo de raíz fresca) e influir en el crecimiento de las plantas de manera positiva bajo ciertas condiciones ambientales del suelo (Spaepen *et al.*, 2009). La mayor parte de la investigación molecular se ha centrado en las rizobacterias, también clasificadas como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) (Bulgarelli *et al.*, 2013).

Las BPCV pueden promover el crecimiento de las plantas directamente, ya sea facilitando la adquisición de recursos o modulando los niveles hormonales de las plantas, o indirectamente al disminuir los efectos inhibitorios de varios agentes patógenos sobre el crecimiento y el desarrollo de las plantas, es decir, al actuar como bacterias de biocontrol (Glick, 1995; Glick, 2012).

I.12.1 Propiedades promotoras del crecimiento vegetal

Los mecanismos mejor estudiados para promover el crecimiento vegetal, incluyen proporcionar a las plantas los nutrientes que les faltan, como nitrógeno, hierro y fósforo, principalmente (Glick, 2012).

I.12.1.1 Producción de sideróforos

El hierro es esencial para el crecimiento de todos los organismos, y la mayoría de los organismos dependen de este elemento como cofactor para importantes procesos bioquímicos, tales como la unión de oxígeno, el transporte de electrones y catálisis (Fukushima *et al.*, 2013) que juegan un papel importante en la adquisición de iones férricos (Fe^{3+}) de minerales y compuestos orgánicos en la rizosfera (Fukushima *et al.*, 2013). La unión de sideróforos con iones férricos libres de medio ambiente facilita la formación de complejos sideróforos-hierro que son transportados de regreso a las células bacterianas a través de receptores específicos (es decir, proteínas de unión a los sideróforos) en la membrana celular. En las bacterias gram-positivas; las proteínas de unión a sideróforos, las permeasas y las ATPasas están involucradas en el transporte de complejos sideróforo-hierro al citoplasma (Fukushima *et al.*, 2013), donde los iones férricos se reducen a iones ferrosos (Fe^{2+}), quedando así disponible para el crecimiento vegetal (Saha *et al.*, 2013).

I.12.1.2 Solubilización de fósforo

Las estrategias para mejorar la disponibilidad o absorción de fósforo (P) pueden contribuir significativamente al crecimiento de las plantas, porque menos del 5% del contenido de fósforo de los suelos está biodisponible para las plantas. Los microorganismos con capacidad para solubilizar el fósforo mineral son abundantes en la mayoría de los suelos (hasta el 40% de la población cultivable) (Bulgarelli *et al.*, 2013). Hay dos componentes de P en el suelo; fosfatos orgánicos e inorgánicos. Una gran proporción está presente en formas insolubles, por lo tanto, no está disponible para la nutrición de las plantas. El P inorgánico ocurre en el suelo, principalmente en complejos minerales insolubles, algunos de los cuales aparecen después de la aplicación de fertilizantes químicos. Estas formas precipitadas no pueden ser absorbidas por las plantas. La materia orgánica, por otro lado, es un reservorio importante de P inmovilizado que representa del 20 al 80% del P del suelo (Richardson, 1994). Convertir fosfatos insolubles (tanto orgánicos como inorgánicos) es una forma accesible para las plantas, como el ortofosfato, es un rasgo importante para una BPCV para aumentar así el rendimiento de las plantas (Richardson, 1994; Rodríguez *et al.*, 2006).

I.12.2 Fitohormonas del crecimiento vegetal

Las fitohormonas, a menudo consideradas como reguladores del crecimiento de las plantas, ya que estimulan la densidad y la longitud de los pelos radiculares (Podile *et al.*, 2007), se refieren a los compuestos derivados de las vías biosintéticas de las plantas que pueden actuar localmente (sitio de síntesis) o transportarse a otro sitio dentro del cuerpo de la planta para mediar las respuestas de crecimiento y desarrollo, condiciones ambientales y estresantes (Peleg *et al.*, 2011; Fahad *et al.*, 2014). El crecimiento y desarrollo en las plantas está regulado de manera coordinada por la actividad de varias fitohormonas como el ácido abscísico (ABA), las giberelinas (GA), etileno (ETHY), auxinas (IAA), citoquininas (CK) y brasinoesteroides (BR), que controlan muchos procesos fisiológicos y bioquímicos (Iqbal *et al.*, 2014; Fahad *et al.*, 2014). Sin embargo, en los últimos años, nuevos compuestos como poliaminas, óxido nítrico (NO) y estrigolactona también se han agregado a esta lista (Gray, 2004; Fahad *et al.*, 2014).

I.12.3 Auxinas

En general, las plantas contienen tres auxinas activas de origen natural: ácido indol acético (AIA), ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-AIA) y ácido fenilacético (AFA) (Enders *et al.*, 2015; Simon *et al.*, 2011). De estos, AIA es la auxina más abundante e importante (Simon y Petrasek 2011). La auxina ácido indol-3-acético (AIA) es una fitohormona cuantitativamente importante producida por las BPCV, juega un papel importante en la regulación del desarrollo y el crecimiento de las plantas, afectando procesos tales como la división y elongación celular, tropismos, dominancia apical, senescencia, floración y respuesta al estrés (Mano y Nemoto 2012; Teale *et al.*, 2006; Woodward y Bartel 2005; Yang *et al.*, 2014). Esta molécula se aisló e identificó hace décadas y las vías principales para la biosíntesis de AIA ya se han dilucidado (Figura 5) (Mashiguchi *et al.*, 2011; Stepanova *et al.*, 2011; Won *et al.*, 2011). El principal precursor de la biosíntesis es el triptófano, pero se han descrito múltiples vías de biosíntesis en microorganismos asociados a plantas, incluidos los microorganismos patógenos. Las rutas de biosíntesis de auxina mejor caracterizadas son: indol-3-acetamida (IAM) e indol-3-piruvato (IPyA) (Bulgarelli *et al.*, 2013).

En la primera vía IAM, la cual es asociada a microorganismos patógenos. Como se observa en la Figura 5, el triptófano se convierte en IAM por una monooxigenasa de triptófano; en un segundo paso, AIA se forma por la conversión de IAM por una hidroxilasa IAM (Bulgarelli *et al.*, 2013). En la segunda vía, que se encuentra principalmente en bacterias beneficiosas, el triptófano se transamina a IPyA; en una segunda etapa de limitación de velocidad, IPyA se descarboxila mediante una descarboxilasa de IPyA o descarboxilasa de fenilpiruvato a indol-3-acetaldehído, que finalmente se oxida a AIA (espontáneamente o mediante un aldehído oxidasa/deshidrogenasa) (Bulgarelli *et al.*, 2013).

Hay cinco rutas de biosíntesis de auxina dependientes de triptófano propuestas en bacterias (Figura 5): la ruta del indol-3-acetamida (IAM), la ruta del ácido indol-3-ácido pirúvico (IPyA), la ruta de la triptamina (TAM), el indol-3-acetonitrilo (Vía IAN) y vía triptófano oxidasa de cadena lateral (TSCO); y una vía independiente de triptófano (Di *et al.*, 2015).

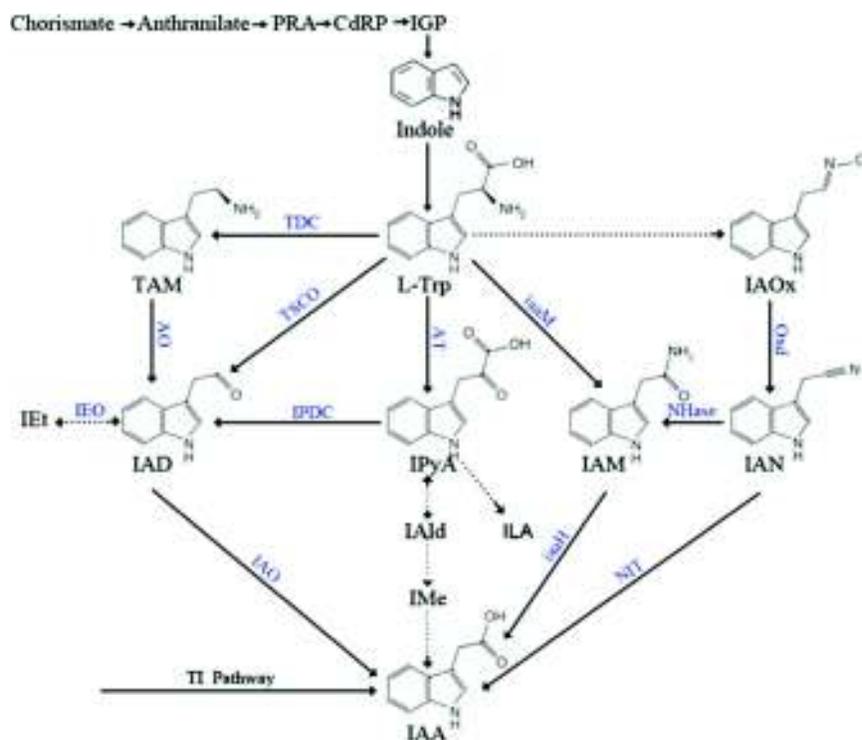


Figura 5. Las vías de biosíntesis de auxina propuestas en bacterias. imagen tomada de Di *et al.*, 2015. Adaptación de Spaepen *et al.* 2007 y Patten *et al.*, 2013 modificada por Di *et al.*, 2015. Se indican las enzimas y los metabolitos intermedios involucrados en estas vías.

I.13 Fijación de Nitrógeno

Se cree que el secuestro neto de carbono y nitrógeno orgánico por las raíces estimula la multiplicación microbiana del suelo en la vecindad de los tejidos de la raíz por qué; 1) las bacterias del suelo más conocidas son organótrofos, es decir, derivan la energía para el crecimiento de sustratos orgánicos y 2) La accesibilidad y disponibilidad de compuestos orgánicos son limitadas en la mayoría de los suelos (Alden *et al.*, 2001, Demoling *et al.*, 2007).

La fijación biológica de nitrógeno es el proceso para reducir el dinitrógeno gaseoso a amoníaco mediante el complejo enzimático de nitrógenoasa ($N_2 + 8H + + 16 ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16Pi$), éste proceso no está restringido a microorganismos simbióticos; la capacidad biológica de fijación de nitrógeno *in vitro* también se ha demostrado para la rizosfera (Bulgarelli *et al.*, 2013).

Las bacterias proporcionan una pequeña cantidad del nitrógeno fijado necesario para la planta huésped asociada con las bacterias (James *et al.*, 1998). Los genes de nitrogenasa (*nif*) necesarios para la fijación de nitrógeno, incluyen genes estructurales implicados en la activación de la proteína Fe (constituda por Hierro), biosíntesis del cofactor de MoFe (hierro y molibdeno), donación de electrones y genes reguladores necesarios para la síntesis. En las bacterias diazotróficas (fijadoras de nitrógeno), los genes *nif* se encuentran típicamente en un grupo de alrededor de 20-24 kb que codifican 20 proteínas diferentes. Dado que el proceso de fijación de nitrógeno requiere una gran cantidad de energía en forma de ATP, lo ideal sería que esos recursos de carbono bacteriano se dirigieran hacia la fosforilación oxidativa, lo que resulta en la síntesis de ATP (Glick, 2012).

El nitrógeno generalmente se considera como uno de los principales nutrientes limitantes en el crecimiento de las plantas. Las secuencias genómicas disponibles de la rizosfera revelan en la mayoría de los casos un metabolismo versátil de carbono y nitrógeno. Se ha estudiado intensamente una conversión específica en el ciclo del nitrógeno: reducción de nitrato disimilatorio o desnitrificación, mediante la cual el nitrato (NO_3^-) se reduce a nitrito (NO_2^-) como una vía respiratoria alternativa. El nitrito puede convertirse además en óxidos de nitrógeno (N_2O y NO) o en amoníaco (NH_4). El NO es una molécula de señalización potente en las plantas

que altera el crecimiento y la proliferación de las raíces de una manera dependiente de las auxinas (Bulgarelli *et al.*, 2013).

I.14 Compuestos Volátiles

El contacto directo entre microorganismos y la planta no siempre es necesario para promover el crecimiento. Algunos microorganismos liberan compuestos orgánicos volátiles (COV) con una capacidad promotora del crecimiento. El caso mejor documentado es *Bacillus subtilis*, que produce los compuestos activos 3-hidroxi-2-butanona (acetoína) y 2,3-butanodiol. Un mutante *knockout* en la ruta de biosíntesis para ambos compuestos demostró la participación directa de los COV en la promoción del crecimiento (Ryu *et al.*, 2003; Bulgarelli *et al.*, 2013). Más tarde, se mostró la producción de COV con actividad promotora del crecimiento para otros géneros bacterianos, como *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Burkholderia* y *Serratia*, y el espectro de compuestos se amplió hacia 1-hexanol, indol y pentadecano (Blom *et al.*, 2011; Ryu *et al.*, 2003). En *B. subtilis*, la producción de COV también induce resistencia sistémica (Ryu *et al.*, 2004; Bulgarelli *et al.*, 2013).

I.15 Control Biológico

El control biológico o biocontrol, es el proceso de los microorganismos que pueden suprimir microorganismos patógenos directa o indirectamente, lo que confiere protección a las plantas. El biocontrol ha sido ampliamente estudiado no solo en condiciones de laboratorio sino también en situaciones de campo, lo que lleva a varios productos comerciales que se usan para controlar una variedad de enfermedades transmitidas por el suelo, capaces de estimular el crecimiento de las plantas y producir diferentes tipos de metabolitos secundarios biológicamente activos que suprimen los microorganismos patógenos de las plantas. La mayoría de los productos se basan en cepas de *Bacillus* y *Trichoderma* debido a problemas de formulación, aunque los productos a base de *Pseudomonas* también se han comercializado (Beg *et al.*, 2009; Bulgarelli *et al.*, 2013).

I.16 Biosíntesis de Compuestos Antimicrobianos

Los microorganismos pueden sintetizar una amplia gama de compuestos con actividad antimicrobiana. Estos compuestos pueden derivarse del metabolismo secundario o son moléculas proteicas (modificadas) derivadas de la síntesis ribosómica o síntesis de péptidos no ribosomales. La producción de compuestos antimicrobianos ha sido ampliamente estudiada en pseudomonas, bacilos y especies de *Trichoderma*, incluida la identificación de las vías de biosíntesis y su regulación. La mayoría de los productos comerciales de biocontrol contienen cepas que pertenecen a estos grupos. Los compuestos bien conocidos y caracterizados son fenazinas, 2,4-DAPG, piroluteorina, pirrolnitrina, tensioactivos de lipopéptidos cíclicos, zwittermicina A y bacteriocinas (Emmert *et al.*, 1999; Weller *et al.*, 2007; Berg *et al.*, 2009; Boller *et al.*, 2009; Perez *et al.*, 2011). Como para la mayoría de los compuestos antimicrobianos, la biosíntesis está regulada por sistemas reguladores de dos componentes y condiciones ambientales (Dubuis *et al.*, 2007; Mavrodi *et al.*, 2006). Aunque las cepas de biocontrol no promueven directamente el crecimiento de las plantas, pueden influir en las BPCV que estimulan directamente el crecimiento de las plantas. (Combes *et al.*, 2011).

I.17 Resistencia Sistémica Inducida

La inoculación de plantas con bacterias no patógenas puede inducir resistencia contra un amplio espectro de organismos patógenos en las partes subterráneas y aéreas. Esta resistencia sistémica inducida (RSI) depende principalmente de la señalización de jasmonato y etileno. De esta manera, las plantas están preparadas para reaccionar más rápida y fuertemente a un ataque de patógenos. La RSI se ha observado para muchos microorganismos y sus determinantes derivados celulares como flagelos, componentes de la envoltura celular y sideróforos (De Vleeschauwer *et al.*, 2009; Zamioudis *et al.*, 2012). Los microorganismos inductores de RSI bien caracterizados incluyen varias especies de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Serratia* y *Trichoderma harzianum*. La mayoría de las respuestas de las plantas se han estudiado en *Arabidopsis thaliana*, pero también se ha observado RSI en frijol, rábano, arroz, tabaco y tomate (De Vleeschauwer *et al.*, 2009; Lugtenberg *et al.*, 2009; Shores *et al.*, 2010).

II. JUSTIFICACIÓN

El chiltepín es un fruto de recolección de gran valor genético, biológico y comercial, principalmente por recolectores de la región, el cual presenta actualmente una disminución en la población de la planta de manera silvestre debido a una falta de criterios de conservación.

Se sabe que la semilla de chiltepín tiene una germinación baja que reduce el asentamiento ecológico y cultivo de la planta, poniendo en riesgo un aprovechamiento sostenido, por lo que se buscan alternativas para la preservación de esta especie en sitios de distribución natural.

Hasta el momento la composición de la comunidad bacteriana del suelo asociada a la planta de chiltepín no es conocida; siendo ésta fundamental en los procesos de los ecosistemas impulsando los ciclos biogeoquímicos.

En general muchos suelos carecen de una cantidad suficiente de nutrientes para que el crecimiento de las plantas sea óptimo. Por lo tanto, para evitar este problema y obtener mayores rendimientos, los agricultores se han vuelto cada vez más dependientes de las fuentes químicas de nitrógeno y fósforo. Además de ser costoso, y plantea riesgos humanos y ambientales. Por este motivo, se está realizando un enfoque más sostenible. Se prevé que, en la agricultura, la horticultura, la silvicultura y las estrategias de limpieza ambiental en un futuro no muy lejano, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) comenzarán a reemplazar el uso de los productos químicos en este campo.

III. HIPÓTESIS

Existe un grupo en común de bacterias inherente a la rizosfera del chiltepín, dentro del cual, está presente un grupo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) asociadas con cada uno de los municipios y época del año. Además, existirá otro grupo de bacterias dependientes al lugar y ambiente del chiltepin silvestre y cultivado.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo General

Analizar las comunidades bacterianas e identificar las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) asociadas al chiltepín silvestre y cultivado (*C. annuum* L. var. *glabriusculum*) según su ubicación y época del año.

IV.2 Objetivos Específicos

1. Determinar las características del suelo, cultivo y aislamiento de microorganismos cultivables.
2. Analizar las características metabólicas de las bacterias aisladas.
3. Identificar BPCV mediante la extracción de ADN de cepas aisladas de interés, identificándolas por secuenciación del gen 16S rRNA.

V. METODOLOGÍA

V.1 Área de Estudio

El muestreo de suelo asociado a la planta de chiltepín se realizó en cuatro municipios del estado de Sonora. El muestreo de suelo asociado al chiltepín cultivado se realizó en la localidad de San Pedro El Saucito en el municipio de Hermosillo (N 29°12.479' W 110°54.186'). Para el caso de chiltepín silvestre, se muestreó suelo proveniente de tres municipios del Estado de Sonora: Rancho la Mora en Banámichi (N 29°58.490' W 110°06.946'), Rancho La Montosa en Moctezuma (N 29°34.614' W 109°57.675') y la localidad de Merésichic en Opodepe (N 30°03.234' W 110°42.871'). Se tomaron tres puntos de referencia asociados cada uno con la planta de chiltepín (Figura 6).

El muestreo se realizó durante tres diferentes épocas del año 2017:

- a-) Época seca: abril-mayo.
- b-) Época de lluvia: julio-agosto.
- c-) Época post-lluvia: septiembre-octubre.

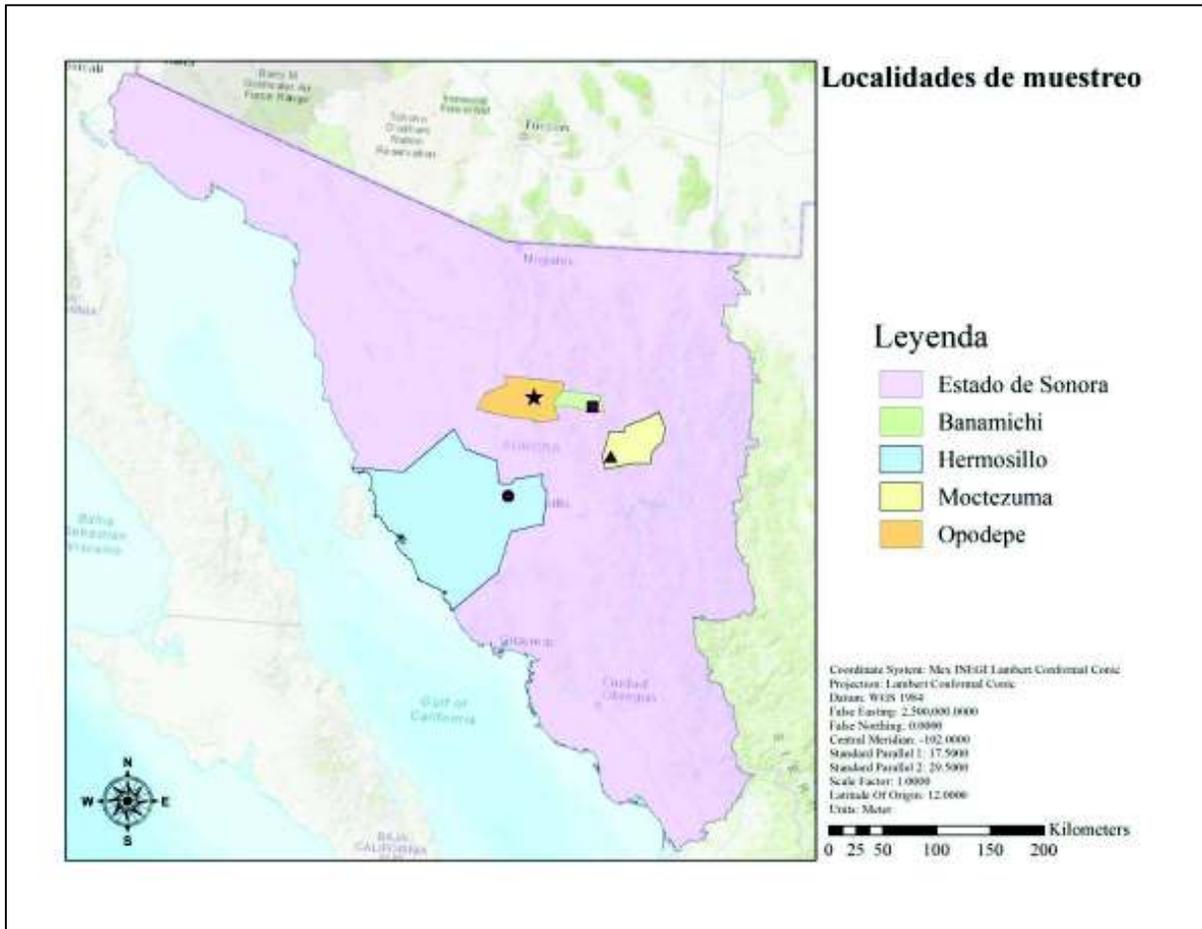


Figura 6. Localización geográfica de los municipios donde se realizaron los muestreos en el estado de Sonora, México, 2019. Realizado en Arcmap.

V.2 Zonas Muestreadas

V.2.1 Municipio de Hermosillo; localidad de San Pedro El Saucito

La localidad de San Pedro el Saucito está situada en el Municipio de Hermosillo ubicado al oeste del Estado de Sonora localizado en el paralelo $29^{\circ} 05'$ de latitud norte y el meridiano $110^{\circ} 57'$ de longitud oeste de Greenwich a una altura de 282 msnm, posee una superficie de 15,720.35 kilómetros cuadrados, que representa el 8.02 % del total estatal y el 0.76 % en relación nacional. Las localidades que forman parte del municipio son: San Pedro el Saucito, Miguel Alemán, Bahía Kino, Kino Nuevo, La Victoria y La Manga (INAFED, 2019).

La orografía corresponde a zonas semiplanas con una extensión aproximada de 20 % del territorio municipal y se localiza en todo el municipio (INAFED, 2019).

San Pedro el Saucito tiene un total de 2,938 habitantes, con un clima muy seco temperaturas de 14 a 16°C en los meses de enero y febrero, con extremas de 31 a 47°C en los meses de julio y agosto. El régimen de lluvias en la región se presenta en los meses de junio, julio, agosto y septiembre con una precipitación pluvial de entre 200 a 300 mm (INAFED, 2019).

En la localidad se localizan diferentes tipos de suelo; regosol y yermosol que se encuentra principalmente en la parte norte (INAFED, 2019).

Las muestras de suelo obtenidas en este municipio son muestras asociadas al cultivo de chiltepín en casa sombra, con sistema de riego, y utilización de fertilizantes (Figura 7).



Figura 7. Cultivo de chiltepín en casa sombra, localidad de San Pedro el Saucito en el municipio de Hermosillo, Sonora, México.

V.2.2 Municipio de Moctezuma, Rancho La Montosa

El municipio está ubicado en el centro del Estado de Sonora, su cabecera es la población de Moctezuma y se localiza en el paralelo 29° 47' de latitud norte y a los 109° 40' de longitud al oeste del meridiano de Greenwich; a una altitud de 677 msnm. Cuenta con un clima seco, semicálido con una temperatura media máxima anuales de 29°C en los meses de junio y julio y una temperatura mínima anual de alrededor de 12°C en los meses de diciembre y enero, la

temperatura media anual es de 12.2°C. La precipitación promedio anual ronda en los 491.4 mm (INAFED, 2019).

Posee una superficie de 1,867.3 km² que representan el 0.95% del total estatal y el 0.09% del nacional. Está situado este municipio entre dos macizos montañosos que dependen de la Sierra Madre Occidental y que corren de norte a sur, dejando un valle de corta extensión. Entre las sierras destacan: la de La Cieneguita, en el oeste de la localidad y al este de la sierra de Huásabas (INAFED, 2019).

El municipio se encuentra en la cuenca del Río Moctezuma que nace al norte de mineral de Nacozari, corre de norte a sur en todo su trayecto, teniendo múltiples afluentes con escasas cantidades de agua (INAFED, 2019).

En el municipio se localizan diferentes tipos de suelo: a-) cambisol: se localiza al norte, sur y suroeste del municipio; son suelos jóvenes, poco desarrollados, tienen cualquier tipo de vegetación, la cual se encuentra condicionada por el clima y no por el tipo de suelo. Su susceptibilidad a la erosión es moderadamente alta (INAFED, 2019).

Las muestras de suelo obtenidas en éste municipio fueron asociadas a las plantas de chiltepín con mayor tamaño del fruto y cantidad del mismo (Figura 8).



Figura 8. Municipio de Moctezuma, Rancho La Montosa.

V.2.3 Municipio de Banámichi, Rancho La Mora

El municipio está ubicado en el norte del estado de Sonora, su cabecera es la población de Banámichi y se localiza en el paralelo 30° 01' de latitud norte y a los 110° 13' de longitud al oeste del meridiano de Greenwich (INAFED, 2019).

El municipio de Banámichi, se encuentra ubicado en el margen izquierdo del Río de Sonora, en la parte centro noreste del Estado, a 165 km. de la capital, presentando una altura de 550 msnm. Colinda al norte con el municipio de Arizpe, al sur con Huépac, al este con Cumpas, al suroeste con San Felipe de Jesús y al oeste con el municipio de Opodepe (INAFED, 2019).

Posee una superficie de 807.70 km², que representan el 0.42% del total estatal y el 0.03% del nacional. Las localidades más importantes son: Las Delicias y La Mora (INAFED, 2019).

Su extensión territorial es de 773.6 km² que representa el 0.42 % del total del Estado y el 1.6 % de la superficie total nacional (INAFED, 2019).

Entre los recursos hidrológicos con que cuenta el municipio para el desarrollo de sus actividades destaca el río Sonora, además existen algunos arroyos con caudal solamente en épocas de lluvias: La Cañada de la Mora, el Oro, Guitonchi, La Cruz, Onofre, Los Vallecitos, El Salmón, Los Tatos, localizados al oeste del río Sonora; El Chinal, Las Delicias, Opodepe, entre otros, localizados al oeste del río Sonora (INAFED, 2019).

El municipio de Banámichi cuenta con un clima seco semicálido, con una temperatura media máxima mensual de 29.3° C en los meses de julio a septiembre y media mínima mensual de 13.3° C de diciembre a febrero. La temperatura media anual de 21.4° C. El período de lluvias se presenta en verano en los meses de julio y agosto contándose con una precipitación media anual de 424 mm; hay heladas frecuentes de noviembre a marzo por su proximidad a la sierra del río Sonora (Figura 9) (INAFED, 2019).

En el municipio se localizan diferentes tipos de suelo: a-) cambisol: se localiza en una reducida porción de la zona noreste y presenta fase física gravosa; son suelos jóvenes, poco desarrollados, pueden tener cualquier tipo de vegetación, la cual se encuentra condicionada por el clima y no por el tipo de suelo; es de moderada a alta su susceptibilidad a la erosión; b-) feozem: se localiza al sur en un área reducida, tiene una capa superficial oscura, suave y rica en materia orgánica y nutrientes, en condiciones naturales tiene cualquier tipo de vegetación; su

susceptibilidad a la erosión depende del tipo de terrenos: Litosol: se localiza al noreste y presenta diversos tipos de vegetación que se encuentran en mayor o menor proporción en laderas, barrancas, lomeríos y algunos terrenos planos; su susceptibilidad a la erosión depende de la pendiente del terreno (INAFED, 2019).



Figura 9. Municipio de Banámichi, Rancho La Mora.

V.2.4 Municipio de Opodepe, localidad Merésichic

El municipio está ubicado en el norte del Estado de Sonora, su cabecera es la población de Opodepe y se localiza en el paralelo 29° 55' de latitud norte y a los 110° 37' de longitud al oeste del meridiano de Greenwich; La localidad se encuentra a una altura de 700 msnm. Posee una superficie de 2,237.1 km², que representan el 1.51 % del total estatal y el 0.14 % nacional (INAFED, 2019).

El territorio del municipio es generalmente plano, correspondiendo a la zona de llanuras y en los límites con San Felipe de Jesús y Banámichi se encuentran las sierras Los Hornitos, Del Carrizo, Loreto y Minucutachi (INAFED, 2019).

El río San Miguel penetra en la jurisdicción municipal, procedente del Cucurpe, pasa por Rayón y San Miguel de Horcasitas; une al río Sonora en el municipio de Hermosillo y cuenta con 30 arroyos de caudal solamente en época de lluvias (INAFED, 2019).

El municipio de Opodepe cuenta con un clima seco semicálido, con una temperatura media máxima mensual de 29° C en los meses de junio y julio y una temperatura media mínima mensual de 13.3° C. La época de lluvias se presenta en verano en los meses de julio y agosto, con una precipitación media anual de 424 mm. Ocasionalmente heladas en los meses de noviembre y marzo (INAFED, 2019).

En el municipio se localizan diferentes tipos de suelo: a-) litosol: se localiza al noroeste del municipio, presenta muy diversos tipos de vegetación que se encuentra en mayor o menor proporción e ladera, barrancas, lomeríos y algunos terrenos planos. La susceptibilidad a la erosión depende de la pendiente del terreno; b-) regosol: se localiza al centro, desplazándose al este del municipio, presentando fase física lítica, gravosa y pedregosa; su fertilidad es variable y el uso es agrícola está condicionado a su profundidad. Su susceptibilidad a la erosión es muy variable y depende de la pendiente del terreno; c-) xerosol: se localiza al oeste del municipio desplazándose de norte a sur, presenta fase química salina; tiene una capa superficial de color claro y muy pobre en humus, su utilización agrícola está restringida a zonas de riego con muy altos rendimientos debido a su alta fertilidad. Su susceptibilidad a la erosión es baja; d-) yermosol: se localiza al centro desplazándose al oeste del municipio, presentando fase química sódica. Tiene una capa superficial color claro y muy pobre en materia orgánica, su vegetación natural es de pastizales y matorrales; su utilización agrícola está restringida a zonas de riego con muy altos rendimientos en cultivos como: algodón y granos, su susceptibilidad a la erosión es baja (INAFED, 2019).

En cada zona de muestreo se asocio a diferentes plantas de chiltepín, en este municipio en específico se cuenta con diferentes tipos de colores en los frutos, Zona A chiltepín con frutos de color café, zona B color Rojo y zona C color Amarillo (Figura 10).



Figura 10. Municipio de Opodepe, localidad Merésichic.

V.3 Metodología de Muestreo

En cada municipio se tomaron muestras en 3 zonas (A, B y C), excepto el municipio de Opodepe el cual cuenta con una zona extra “D”, formando un zigzag en el área, excavando 20 cm de profundidad en cada planta de chiltepín (Figura 11).

Cada zona estuvo compuesta por tres submuestras que representaron suelo de diferentes plantas de chiltepín, separadas 10 m entre cada una; las submuestras de cada zona fueron homogenizadas en una única muestra, tamizadas a través de una malla de 2 mm para su homogenización, rotura de los agregados, retiro de las raíces y residuos vegetales. Parte de las muestras de suelo se almacenaron a -80°C para estudios moleculares y otra parte se utilizó para los diferentes análisis físicos-químico de suelo presentados a continuación.

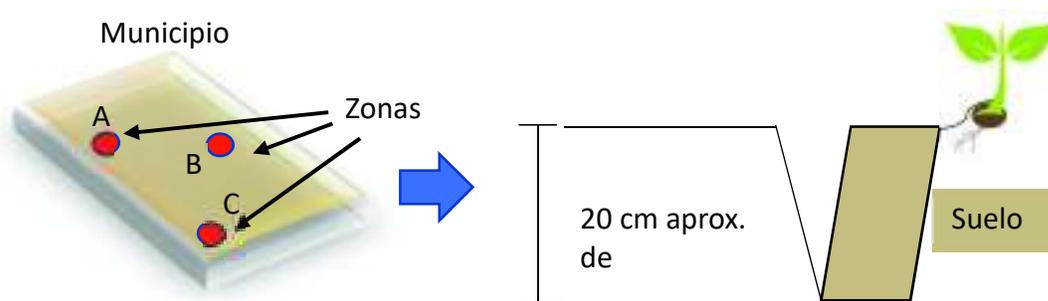


Figura 11. Diagrama de toma de muestras de suelo en cada municipio de interés. La lista de las coordenadas por municipio y por zona se muestran en el Anexo Tabla A1.

V.4 Análisis Físico-químico del Suelo

V.4.1 Medición de pH del suelo

Se pesaron 15 gr de suelo del pool de cada municipio y época del año muestreado, al cual se agregó 60 ml de agua destilada y se agitó. Se colocó en el potenciómetro (HANNA® instruments, Medidor de pH Modelo HI2211-01) previamente calibrado y se tomó la medición siguiendo la metodología descrita por la ISO 10390:2005.

V.5 Humedad

V.5.1 Método gravimétrico

Se utilizaron taras de aluminio, realizando 6 repeticiones por zona. Primero se pesó las taras con 10 g de suelo, se dejó secar por 24 horas en un horno de secado a 110°C y se volvieron a pesar las taras.

Se siguió la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{((\text{tara} + \text{suelo húmedo}) - (\text{tara} + \text{suelo seco}))}{((\text{tara} + \text{suelo húmedo}) - \text{peso de tara})} \times 100$$

Esta técnica se realizó por cada muestra por triplicado, obteniendo un promedio de cada zona, para cada municipio.

V.6 Reserva de Nitrógeno Inorgánico en Suelo

Los microorganismos están involucrados en el ciclo de nitrógeno en suelos, ya que ellos forman parte de la fijación, nitrificación, desnitrificación y mineralización de nitrógeno, nos pueden mostrar el suministro de nitrógeno disponible para la microflora y las plantas, éste refleja un aspecto del estatus microbiológico del suelo.

La cuantificación de la reserva de nitrógeno inorgánico se realizó en la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos, laboratorio de ecología microbiana, utilizando el protocolo Keeney y Nelson (1982).

El material se limpió exhaustivamente para evitar cualquier impureza que pueda interferir con las determinaciones. Se utilizó jabón neutro, ácido sulfúrico (H_2SO_4), agua y agua destilada.

El primer lavado del material se realizó con agua y jabón; ya con el material limpio sin jabón, se sumergió en ácido sulfúrico 1:10 por 30 minutos (H_2SO_4 10 ml + H_2O destilada 900 ml). El segundo lavado se realizó con agua destilada dejándose secar a temperatura ambiente.

Para ello se mezclaron 10 gramos de muestra de suelo con 60 ml de cloruro de potasio (KCl) 1M, se dejó en agitación a 250 rpm por 60 min. Después se sedimentó la muestra y se tomó el sobrenadante, realizando un filtrado del líquido con papel filtro. Se almacenó y congeló a $-20^\circ C$ para el análisis mediante espectrofotometría.

V.6.1 Determinación de amonio

Se realizó en análisis colorimétrico de NH_4-N (Amonio como nitrógeno) siguiendo el protocolo de Keeney y Nelson (1982).

El amonio reacciona con salicilato e hipoclorito en una solución alcalina tamponada en presencia de nitroprusiato de sodio $Na_2[Fe(CN)_5NO]$ para formar el análogo de ácido salicílico $C_7H_6O_3$ del azul de indofenol. Los análisis colorimétricos se realizaron utilizando un espectrofotómetro (LAMBDA 850+ UV/Vis Perkin Elmer, EU). Las lecturas se realizaron a 660 nm.

Los materiales utilizados fueron: cubeta 1 cm³, dos matraces volumétricos de 1000 ml, siete matraces volumétricos de 100 ml, tubos de ensayo 13x100 mm, dos pipetas graduadas de 5 ml y una micropipeta 1000 µl.

Se utilizó los siguientes reactivos: Ácido salicílico C₇H₆O₃, Citrato de sodio Na₃C₆H₅O₇, Tartrato de sodio C₄H₄Na₂O₆, Hidróxido de sodio (NaOH), Hipoclorito de sodio (NaClO), Nitroprusiato de sodio Na₂[Fe(CN)₅NO] y Sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄.

Para la preparación del agente de color, se disolvió en un matraz volumétrico de 1000 ml 34 g de ácido salicílico, 25 g de citrato de sodio y 25 g de Tartrato de sodio en 750 ml de agua destilada, se agregó 0.12 g nitroprusiato de sodio, se disolvió y aforó a 1000ml.

En la preparación de la solución alcalina de hipoclorito se disolvió 30 g de hidróxido de sodio (NaOH) en 750 ml de agua destilada. Se agregó 10 ml de hipoclorito de sodio (NaClO) (>5% disponible de cloruro) y se aforó a 1000 ml.

Para la cuantificación se elaboraron curvas de calibración de amonio NH₄-N. Se preparó una solución madre disolviendo 0.4719 g de sulfato de amonio en 100 ml de agua destilada en un matraz volumétrico de 100 ml se mezcló y aforó. Se pipeteó 0, 0.5, 1, 1.5, 2.0, y 2.5 ± 0.001 ml de la solución madre en matraces volumétricos de 100 ml obteniendo estándares de trabajo de 0, 5, 10, 15, 20 y 25 mg NH₄-N⁻¹.

Se transfirió una alícuota de 0.1 ml de muestra/solución estándar a un tubo de ensayo, se agregó 5.0 ml del agente de color se mezcló bien y se dejó reposar 15 min. Se agregó 5.0 ml de Solución alcalina de hipoclorito y se mezcló bien. Se dejó reposar 1 h y se leyó la absorbancia a 660 nm. El cálculo se realizó utilizando las absorbancias obtenidas de las muestras, trazando una curva de calibración a partir de la lectura de absorbancia frente a las concentraciones estándar, la muestra determinada y la concentración del blanco. Se calculó la concentración de muestra corregida (C) por la diferencia de muestra menos la concentración del blanco.

$$\text{NH}_4\text{-N}^{-1}(\text{mg Kg}^1) = C/\text{peso de muestra}$$

El peso de muestra hace referencia al peso medido en la extracción en este caso

10 gr.

V.6.2 Determinación de nitrito

Se realizó en análisis colorimétrico de $\text{NO}_2\text{-N}$ (nitrito como nitrógeno) siguiendo el protocolo de Keeney y Nelson (1982).

El nitrito en el suelo forma sal de diazonio con sulfanilamida, una amina aromática primaria en solución ácida. La absorbancia se midió a 540 nm después del acoplamiento con N-(1-naftil)-etilendiamina.

Los materiales utilizados: espectrofotómetro cubeta 1cm^3 , dos matraces volumétricos de 1000 ml, cuatro matraces volumétricos de 100 ml, dos pipetas graduadas de 5 ml, dos micropipetas 20-100 μl y 100-1000 μl , seis matraces volumétricos de 50 ml, dos pipetas graduadas de 5 ml y 10 ml, matraces volumétricos de 25 ml.

Se utilizó los siguientes reactivos: Ácido clorhídrico HCl al 37%, Sulfanilamida $\text{H}_2\text{NSO}_2\text{NH}_2$, [N-(1-Naftil) Etilendiamina], diclorhidrato $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2$, Nitrito de sodio NaNO_2

Preparación de ácido clorhídrico HCl 2.4 M; se agregó 19.93 ml de HCl al 37% y se aforó matraz volumétrico a 100 ml.

Preparación de HCl 0.12 M se agregó 0.995 ml de HCl al 37% y se aforó en matraz volumétrico de 100 ml.

Preparación de solución de sulfanilamida (reactivo de diazotación) se agregó 0.5 g de sulfanilamida, se diluyó en 100 ml de HCl 2.4 M y se guardó a 4°C .

Preparación de reactivo de acoplamiento, solución de [N-(1-Naftil) Etilendiamina] diclorhidrato; se realizó agregando 0.3 g de [N-(1-Naftil) Etilendiamina] diclorhidrato en 100 ml de HCl 0.12M y se guardó a 4°C .

Para la cuantificación se elaboraron curvas de calibración de nitrito $\text{NO}_2\text{-N}$ utilizando la solución estándar de nitrito ($1000\text{ mg NO}_3\text{-N l}^{-1}$), se disolvió 4.925 g de nitrito de sodio (NaNO_2) en 600 ml de agua destilada en matraz volumétrico de 1000 ml se mezcló y aforó.

Preparación de solución estándar intermedia de nitrito, se utilizó 10 mg de $\text{NO}_3\text{-N l}^{-1}$ en 10 ml de la solución estándar con 1000 ml de agua destilada y se mezcló bien, se pipeteó 0, 50, 100, 200, 400 y 600 μl en matraces volumétricos de 50 ml y se aforó con agua destilada y se leyó absorbancia a 540 nm.

Se transfirió 1 ml de la muestra con 20 ml de agua destilada en un matraz volumétrico de 25 ml se agregó 500 µl de solución de sulfanilamida (reactivo de diazotación) y se mezcló bien, se dejó durante 5 min, después se agregó 500 µl del reactivo de acoplamiento, se mezcló bien y se dejó durante 20 min para permitir que el color se desarrolle y se leyó absorbancia a 540 nm. Se trazó la curva de calibración de las absorbancias estándar frente a las concentraciones; se leyó la concentración de muestra de la gráfica y se calculó la ecuación de regresión de primer orden. la concentración de nitrito en el suelo viene dada por la ecuación.

$$\text{NO}_2\text{-N (mg Kg}^{-1}\text{)} = Ca * Fe * Ve / W$$

Ca: concentración corregida

Ve: volumen total del extracto de suelo

W: peso seco de la muestra de interés

Fe: factor de dilución el cual es de 25

V.6.3 Determinación de nitrato

Se realizó en análisis colorimétrico de NO₃-N (Nitrato como nitrógeno) siguiendo el protocolo de Keeney y Nelson (1982).

Se utilizó los siguientes reactivos: Hidróxido de sodio (NaOH), Ácido salicílico C₇H₆O₃, Ácido sulfúrico H₂SO₄ concentrado (95-97%), Nitrato de potasio KNO₃

Preparación de Hidróxido de sodio 4M (NaOH): se disolvió 160 g de NaOH en 600 ml de agua destilada en matraz volumétrico de 1000 ml, se mezcló bien y se aforó a volumen.

Preparación de Ácido salicílico 5%: se disolvió 12.5 g de ácido salicílico en 237.5 ml de ácido sulfúrico concentrado (95-97%).

Para la cuantificación se elaboraron curvas de calibración de Nitrato NO₃-N

Preparación de la solución estándar 1000 mg de NO₃-N l⁻¹, se disolvió 0.7233 g de nitrato de potasio en agua destilada en matraz volumétrico de 100 ml, se pipeteo 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 µl de la solución estándar en matraces volumétricos de 100 ml y se aforó, para obtener 0, 2, 4, 6, 8 y 10 mg NO₃-N l⁻¹ de esta solución.

Se agregó 500 µl de cada muestra/estándar en un tubo de ensayo 13x100 mm para después adicionar 1 ml de la solución de ácido salicílico 5%, se mezcló bien inmediatamente y se dejó reposar 30 min, ya pasado el tiempo se le agregó 10 ml de hidróxido de sodio 4M y se dejó reposar 1 h, permitiendo el desarrollo de color.

Se leyó absorbancia a 410 nm.

Se trazó la curva de calibración de las absorbancias estándar frente a las concentraciones; se determinó la concentración de muestras y blancos. Después de la corrección de la media de los blancos, la concentración de Nitrato en el suelo viene dada por la ecuación.

$$\text{NO}_3\text{-N (mg Kg}^{-1}\text{)} = C * V / W$$

C: la concentración corregida

V: volumen final de muestra

W: Peso seco

V.7 Determinación de Microorganismos Cultivables

Se utilizó la técnica de cultivo de diluciones seriadas con tres réplicas, a diferentes concentraciones para realizar las lecturas de cada unidad formadora de colonias (UFC) a diferentes tiempos.

Por cada medio de cultivo se realizaron diluciones a 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , realizándose lecturas cada 24h, 48h y 72h en el laboratorio de Microbiología del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora.

Se utilizó el medio de cultivo Agar nutritivo: utilizado para todo tipo de bacterias, suplementado con Terbinafina a una concentración de 13.99 mg/ml, que es un antimicótico de amplio espectro.

V.7.1 Asilamiento

Se realizó el aislamiento de colonias mediante resiembra, se tomaron cajas Petri con las UFC seleccionadas y se identificaron las cepas con características macroscópicamente diferentes y

mayormente abundantes para cada sitio, este proceso se realizó para bacterias de todas las zonas y los cuatro municipios del estado de Sonora en cada época del año.

La resiembra de las especies microbianas aisladas se colectó y almacenó en crioviales a -80°C , los cuales contenían Glicerol al 50% y agar nutritivo.

V.7.2 Selección de cepas bacterianas de interés

Se realizó la descripción de la morfología celular bacteriana mediante la tinción de Gram; además de la descripción de la morfología y la pigmentación de las colonias de cada cultivo puro sembrado en placas Petri con medio sólido mediante la observación macroscópica.

V.8 Evaluación *in vitro* de Propiedades Promotoras del Crecimiento Vegetal de Aislamientos Provenientes del Suelo

La caracterización metabólica de las bacterias aisladas se realizó en la Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON), laboratorio de Biotecnología del Recurso Microbiano, utilizando varios protocolos.

V.8.1 Determinación de la capacidad de solubilización de fosfato inorgánico

Método de Pikovskaya, 1948. modificado por Onyia *et al.*, 2013.

Composición del medio Pikovskaya, suplementado con azul de bromofenol.

Se utilizó los siguientes reactivos: Sulfato de amonio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$, Cloruro de sodio (NaCl), Sulfato de magnesio hidratado $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$, Cloruro de potasio (KCl), Sulfato de manganeso hidratado $(\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O})$, Sulfato de hierro hidratado $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$, Fosfato de calcio $(\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$, Azul de bromofenol, Etanol, Glucosa, Extracto de levaduras y Agar.

Sales Pikovskaya

Tabla 4. Preparación de Sales Pikovskaya 10x: 500 ml

Reactivos:	Cantidad:
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.5 g
NaCl	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
KCl	0.5 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0.01 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g

Azul de bromofenol

Tabla 5. Preparación de azul de bromofenol 100x

Reactivo:	Cantidad:
Azul de bromofenol	0.250 g
Etanol al 20%	Aforar a 100 ml

Se colocaron 350 ml de agua destilada a un matraz de 1 L, se agregó 50 ml de Reactivo sales de Pikovskaya 10x (Tabla 4), en agitación, se agregó: 5 g de Glucosa, 2.5 g de (Ca₃(PO₄)₂) y 0.25 g de extracto de levadura, se midió el pH y se ajustó a 7.0, se agregó 7.5 g de agar, se calentó en agitación hasta que el medio estuvo completamente disuelto, se agregó 5 ml de solución “Azul de bromofenol 100x” (Tabla 5) y se homogeniza, posteriormente se aforó a 500 ml, se esterilizó 15 min a 121 °C y 15 lb de presión, se vació en cajas petri y se dejó solidificar, se inoculó el medio y se dejó se incubar a 37° C durante 7 días (Nautiyal, 1999). Se determinó la eficiencia de solubilización (ES), relacionado las medidas de los diámetros de el halo (DH) y la colonia (DC), siguiendo la siguiente formula.

$$ES = (DH - DC / DC) * 100$$

V.8.2 Determinación de producción de sideróforos

Método de Alexander *et al.*, 1991.

Preparación de medio cromo azurol S (CAS) para identificación de bacterias productoras de sideróforos.

Preparación de solución 1, 2 y 3 se encuentra en Anexos.

Preparación de solución 4.

Se utilizó el siguiente reactivo: ácido casamino; es una mezcla de aminoácidos y algunos péptidos muy pequeños obtenidos de la hidrólisis ácida de la caseína (Mueller *et al.*, 1941).

Se disolvió 3 g de “solución #4” en 30 ml de agua destilada.

Preparación de medio CAS: En campana de flujo laminar previamente esterilizada con alcohol y 15 minutos de luz U.V. Se prosiguió a la preparación del medio; se agregó 70 ml de la solución #3 a 800 ml de la solución #2, posteriormente, se agregó 30 ml de la solución #4, se esterilizó por filtración utilizando un acrodisco (Filtro de jeringa de 13 mm) y una jeringa estéril. Por último, se agregó 100 ml de la solución #1, mezclando cuidadosamente para evitar la formación de burbujas, se vació en cajas petri, se dejó solidificar y las placas se incubaron a 37 °C durante 7 días.

La determinación cualitativa de la solubilización de fosfatos se llevó a cabo por siembra directa en el medio de cultivo al cual se le añadió azul de bromofenol como indicador de pH, lo cual permite observar la producción de ácido por un cambio de coloración de azul a amarillo.

Con los datos de los tamaños del diámetro del halo (DH) y de la colonia (DC) se determinó la eficiencia de producción (EP), siguiendo la siguiente fórmula.

$$EP = (DH - DC / DC) * 100$$

V.8.3 Determinación de la capacidad de producir ácido indol acético (AIA)

Siguiendo el protocolo modificado: De los Santos-Villalobos *et al.*, 2013.

Cada aislado seleccionado (1×10^5 UFC) fue inoculado en Caldo Nutritivo suplementado con 100 ppm de L-triptófano, se dejaron en agitación a 180 rpm durante 5 días a 28°C. Pasado los 5 días se tomó 1 ml de cada cultivo, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min.

La cuantificación de indoles se realizó mediante el método colorimétrico utilizando el reactivo de Salkowski (600 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 18 M, 4.5 g de cloruro férrico ($FeCl_3$) y se aforó a 1L de agua destilada), en relación 2:1 se vertió 100 μ l del sobrenadante de la muestra centrifugada + 200 μ l del reactivo Salkowski, utilizando microplaca de 96 pozos. Las muestras (el sobrenadante) ya adicionadas con el reactivo de Salkowski se colocaron a temperatura ambiente y oscuridad durante 30 min, después se procedió a la lectura de las absorbancias a 530 nm en un lector de absorbancias para microplaca (Varioskan™ LUX Multimode Microplate Reader, Thermo Scientific™). Se elabora una curva patrón en concentraciones de 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, y 150 ppm de ácido indol-3-acético dependiendo de la concentración inicial (se disolvió mg de ácido indol-3-acético en ml de agua destilada, agregar gotas de etanol absoluto para disolver mezcla, se dejó en placa con agitación por 1 h y por último se filtró con acrodisco para jeringa. Se realizaron 3 réplicas para cada cepa. Gráfica de curva patrón de de ácido indol-3-acético; Anexo Figura A1.

V.9 Extracción de ADN de Bacterias Aisladas

El procedimiento realizado fue el modificado a partir de Bergallo *et al.*, 2006.

1. En 600 μ l de buffer de lisis se añadió 500 mg de la muestra y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min.
2. Se separó el sobrenadante en un tubo eppendorff y se añadió 2 μ l de RNasa A y se dejó reposar en hielo por 15 min.
3. Se añadieron 600 μ l de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (PCI) y se centrifugó a 12000 rpm por 20 min.
4. El sobrenadante se separó y se le añadió 600 μ l de isopropanol frío.

5. Se dejó reposar en hielo por 10 min y después se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min.
6. Se eliminó el sobrenadante por decantación y se añadió 600 µl de etanol al 70%.
7. Se centrifugó a 7500 rpm por 5 min.
8. Se eliminó el etanol y se dejaron secar los pellets por 10 a 15 min y se resuspendió en agua libre de nucleasas.

V.9.1 Cuantificación e integridad del ADN bacteriano

El ADN total obtenido de los diferentes tratamientos fue cuantificado mediante espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) utilizando 1 µL de muestra. Para el análisis se consideraron las muestras en las que se obtuvo una relación de absorbancia 260/280 nm y 260/230 en el rango >1.8-2.

La integridad del ADN total se analizó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1 % utilizando 1 µL de GelRed™ (Biotium) como buffer de carga. Las condiciones de electroforesis fueron 95 volts por 1:30 hrs. La visualización del gel de agarosa se realizó en el fotodocumentador Bio-Imaging System MiniBis pro (Bio America Inc).

V.9.2 Amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Amplificación de ADN ribosómico 16S para estudio filogenético utilizando los primers universales sugeridos por Weisburg *et al.*, 1991 (Tabla 6).

Tabla 6. Oligos del gen 16S rRNA utilizados como cebadores para la amplificación por PCR a una amplia gama de bacterias. pb = Pares de bases. Ta = Temperatura de alineación.

Nombre	Secuencia de Primer (5'-3')	Ta (°C)	Longitud de fragmento (pb)
FD1	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	57	1500
RD1	CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC	57	1500

V.9.3 Determinación de los parámetros de PCR

La temperatura de alineamiento y los ciclos se definieron llevando a cabo un gradiente de PCR utilizando el programa “PCR Gradient” en un termociclador SimpliAmp™ (Applied Biosystems™ A24811).

Para definir la temperatura de alineamiento se consideró un rango entre 50°C y 61°C y para determinar la cantidad de ciclos apropiada, para el gen se tomó un rango entre 25 y 35 ciclos, hasta que la amplificación de los productos de PCR, fuera visible en el gel de agarosa al 1% (Tabla 7).

Tabla 7. Estandarización del programa para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Programa PCR			
Desnaturalización	95 °C	5 min	25x ciclos
	95 °C	30 s	
Alineación	57 °C	40 s	
Elongación	72 °C	2 min	
Elongación final	72 °C	5 min	
	4 °C	∞	

V.9.4 Condiciones de reacción de PCR

Dichas condiciones se utilizaron para la mayoría de los aislados de cepas bacterianas del presente estudio (Tabla 8); sin embargo, para dos aislados (1SP1A y 4OP2B) se utilizó el método de Touchdown PCR (Tabla 9).

El touchdown consiste en emplear temperaturas de alineación sucesivamente más bajas, comenzando por una temperatura de alineación alta establecida, la cual, va disminuyendo permisivamente en el transcurso de 10 ciclos, el método de Touchdown PCR consiste en dos fases, la primera es el touchdown y la segunda son ciclos estándar de PCR (Tabla 9) (Korbie *et al.*, 2008).

Tabla 8. Cantidades utilizadas para la preparación de la reacción de PCR. Cada reacción se llevó a cabo con un volumen total de 50 μ l. dH₂O= Agua destilada libre de nucleasas.

Preparación PCR			
	Concentración inicial	Concentración final	Volumen final por 50 μ l de reacción
GoTaq® Colorless Master Mix	2X	1X	25 μ l
ADN molde	N.A	<250ng	1–5 μ l
Forward primer	10 μ M	0.1–1.0 μ M	4 μ
Reverse primer	10 μ M	0.1–1.0 μ M	4 μ l
dH ₂ O llevar a	N.A	N.A	50 μ l

Tabla 9. Programa utilizado de Touchdown PCR para dos cepas aisladas en el presente estudio.

Fase 1- Touchdown	Pasos	Temperatura	Tiempo
	Desnaturalización	95°C	5min
	Desnaturalización	94 C	30 eg
	Alineación	67-57 C(Tm-1 C)	30seg
	Elongación	72 C	30seg
	10xciclos		
Fase 2	Desnaturalización	94 C	30seg
	Alineación	57 C	40seg
	Elongación	72 C	2min
	25xciclos		
Terminación	Elongación final	72 C	5min
	Paro de reacción	4 C	∞

V.10 Preparación de las Muestras para el Envío a Secuenciación Tipo Sanger del Gen 16SrRNA

Los productos de PCR se prepararon para su purificación utilizando el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN TM). Se utilizó un volumen de 100 μ l del producto de amplificación, se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1 % utilizando como 1 μ L de GelRedTM (Biotium) como tinción. Las condiciones de electroforesis fueron 95 volts por 1:30 hrs.

1. Se extrajo el fragmento de ADN del gel de agarosa con un bisturí limpio y afilado.
2. Se pesó el fragmento del gel en un microtubo eppendorf de 2 ml. Seguido de 3 volúmenes de Tampón QG a 1 volumen de gel (100 mg de gel \sim 100 μ l). La cantidad máxima de gel por columna de centrifugado es de 400 mg. Para $>2\%$ de geles de agarosa, agregue 6 volúmenes de QG Buffer.
3. Se incubó a 50 °C durante 10 minutos (o hasta que el gel se disolviera por completo). Se aplicó vortex al tubo cada 2-3 min para ayudar a disolver el gel. Después de que el gel se disolvió por completo, se verificó que el color de la mezcla fuera amarillo (similar al Tampón QG sin disolver la agarosa). Si el color de la mezcla fue naranja o violeta, se agregó 10 μ l de acetato de sodio 3 M, pH 5.0 y mezcló. La mezcla se volvió amarilla.
4. Después se agregó 1 volumen de gel de isopropanol a la muestra y se mezcló.
5. Se colocó una columna de centrifugación QIAquick en un tubo de recolección de 2 ml o en un colector de vacío. Para unir el ADN, se agregó la muestra a la columna QIAquick y se centrifugó a 1 min. Se desechó el flujo y se colocó la columna QIAquick nuevamente en el mismo tubo. Para volúmenes de muestra >800 μ l, se cargó y centrifugó nuevamente.
6. Para lavar, se agregó 750 μ l de tampón PE a la columna QIAquick y se centrifugó durante 1 min. Se desechó el flujo y colocó la columna QIAquick nuevamente en el mismo tubo.
7. Se colocó la columna QIAquick en un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 ml.
8. Para eluir el ADN, se agregó 30 μ l de tampón EB (Tris \cdot Cl 10 mM, pH 8,5) o agua al centro de QIA, se agitó rápidamente la membrana y se llevó a centrifugar la columna durante 1 min (esto se realizó 2 veces). Para aumentar la concentración de ADN, se agregó 10 μ l de tampón

EB al centro de la membrana QIAquick, se dejó que la columna se sostenga durante 1 min y después se centrifugó durante 1 min. Después de agregar Buffer EB a la membrana QIAquick, se aumentó el tiempo de incubación hasta 4 min para aumentar el rendimiento del ADN purificado.

9. Se mandaron los productos purificados al LABSERGEN (Laboratorio de Servicios Genómicos) en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV) Unidad Irapuato bien congelados y empaquetados.

V.11 Análisis Filogenético Molecular

Las secuencias de ADN se analizaron utilizando las herramientas de biocomputación proporcionadas en línea por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). El programa BLASTn (Altschul *et al.*, 1997) se utilizó para el análisis de similitud de secuencia también se utilizó el software ClustalX (Jeanmougin *et al.*, 1998) y Chromas.

Para la alineación de las secuencias de ADN, los análisis evolutivos filogenéticos y moleculares se realizaron utilizando MEGA versión 4 (Kumar *et al.*, 2001). Se infirió un árbol evolutivo basado en la distancia p utilizando el algoritmo de Neighbour-Joining. La prueba de bootstrap se realizó para inferir la fiabilidad del orden de las sucursales, con una ronda de 1000 reensamblado. Los valores de bootstrap por debajo del 50% no se muestran en el árbol.

V.12 Análisis Estadístico

Se procedió a realizar el análisis de varianza (ANOVA) con el que se determinó, si existieron diferencias significativas en los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos realizados, con un nivel de confianza del 95%, Las comparaciones entre las medias de los tratamientos se realizaron mediante la prueba de Tukey. Se utilizó el paquete estadístico JMP® SAS; para la realización de las graficas se utilizo el R 3.6.1 utilizando el paquete ggplot2 (Wickham, 2016).

Para determinar la correlación estadística entre las tres características de BPCV, así como la relación que existe entre los parámetros fisico-quimicos se realizó un Análisis de

Componentes Principales (PCA), en R 3.6.1, utilizando los paquetes: devtools, ggsci, vegan y ggplot2.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

VI.1 Análisis Físico-químico del Suelo

En la Tabla 12 se muestra los diferentes resultados físico-químicos del suelo, donde se evaluó el pH, porcentaje de humedad, conductividad eléctrica, temperatura y unidades formadoras de colonias (UFC) en suelo asociado al chiltepín en los cuatro municipios muestreados; Hermosillo (San Pedro), Moctezuma (Rancho la Montosa), Banámichi (Rancho la Mora) y Opodepe (Meresichic) (Tabla 10).

Tabla 10. Determinación de pH, humedad, temperatura, conductividad eléctrica y unidades formadores de colonia para bacterias, asociados al suelo del chiltepín de 4 municipios del Estado de Sonora en tres épocas del año (seca, lluvia y post-lluvia).

Municipio	Época del año	pH	%Humedad suelo	C.E. (dS/m)	Temperatura (°C)	UFC/g de suelo Bacterias
Hermosillo-San Pedro	Seca	9.06±0.07 ^a	3.47±0.07 ^{def}	1.16±0.17 ^{cd}	29.53±3.88 ^f	6.01x10 ⁴ ±3.57x10 ^{4a}
	Lluvia	9.41±0.02 ^a	4.27±0.07 ^{cde}	1.95±0.42 ^a	33.47±0.79 ^d	2.73x10 ⁴ ±2.16x10 ^{4abc}
	Post-lluvia	9.41±0.02 ^a	4.27±0.07 ^{ef}	1.80±0.44 ^a	24.31±0.40 ^h	4.04x10 ⁴ ±2.98x10 ^{4abc}
Moctezuma-Rancho La Montosa	Seca	7.02±0.08 ^c	4.52±0.18 ^c	0.48±0.17 ^{ef}	20.33±0.59 ⁱ	2.54x10 ⁴ ±2.05x10 ^{4abc}
	Lluvia	6.76±0.13 ^c	21.02±0.44 ^a	1.33±0.56 ^{bc}	37.03±2.10 ^b	4.83x10 ⁴ ±2.31x10 ^{4abc}
	Post-lluvia	6.76±0.65 ^c	4.54±0.02 ^c	0.70±0.24 ^e	35.33±2.22 ^c	2.18x10 ⁶ ±1.59x10 ^{6abc}
Banámichi-Rancho La Mora	Seca	6.68±0.05 ^{cd}	3.03±0.04 ^{fg}	0.55±0.24 ^{ef}	36.38±2.16 ^b	8.11x10 ⁴ ±6.77x10 ^{4abc}
	Lluvia	6.23±0.04 ^e	10.56±0.04 ^b	0.70±0.15 ^e	36.64±3.37 ^b	1.21x10 ⁴ ±5.40x10 ^{4abc}
	Post-lluvia	6.28±0.04 ^{de}	4.34±0.04 ^{cd}	0.42±0.16 ^f	31.43±3.19 ^e	1.21x10 ⁴ ±5.40x10 ^{3bc}
Opodepe-Meresichic	Seca	8.37± 0.13 ^b	1.97± 0.09 ^{gh}	0.56±0.11 ^{ef}	39.24±1.59 ^a	4.2 x10 ⁸ ±0.25 x10 ^{8ab}
	Lluvia	6.56± 0.01 ^c	6.92± 0.1 ^b	1.02±0.26 ^d	26.75±1.07 ^g	5.31x10 ⁹ ±0.11x10 ^{9ab}
	Post-lluvia	8.28± 0.09 ^b	0.95± 0.12 ^h	1.46±0.21 ^b	31.60±0.49 ^e	4.8 x10 ⁹ ±0.44 x10 ^{9c}

VI.2 Temperatura

El chiltepín crece en una variedad de hábitats con suelos profundos y vegetación de hoja perenne, en regiones xéricas en el desierto de Sonora (Quintero *et al.*, 2018). La temperatura máxima promedio es de 38°C y la temperatura mínima promedio es de 5°C, la precipitación media estatal es de 450 mm anuales (Quintero *et al.*, 2018; INEGI 2019). También es asociado a árboles nodriza, crece cerca de cursos de agua y en cañones en las zonas montañosas (Nabhan *et al.*, 1990; González *et al.*, 2011; Kraft *et al.*, 2014).

Un factor importante es la temperatura del suelo, durante la época seca se observaron diferencias significativas en todos los municipios, se obtuvo un rango de temperatura que va de 20.33 °C asociado al municipio de Moctezuma a una temperatura máxima de 39.24 °C presentada en el municipio de Opodepe (Figura 10).

Durante la época de lluvias, se obtuvo un rango de temperatura (Tabla 10) que va de 26°C asociado al municipio de Opodepe a una temperatura máxima de 37 °C presentada en el municipio de Moctezuma. Se observaron diferencias significativas entre los municipios de Opodepe y San Pedro y difieren con respecto a los municipios de Banámichi y Moctezuma, para los cuales no hubo diferencias significativas entre ellos.

Durante la época de post-lluvias, se obtuvo un rango de temperatura de 24.31°C asociado al municipio de San Pedro a una temperatura máxima de 35.33°C presentada en el municipio de Moctezuma. Se observó diferencias significativas entre los municipios de Moctezuma y San Pedro y difieren con respecto a los municipios de Banámichi y Opodepe, los cuales no hubo diferencias significativas entre ellos (Figura 12).

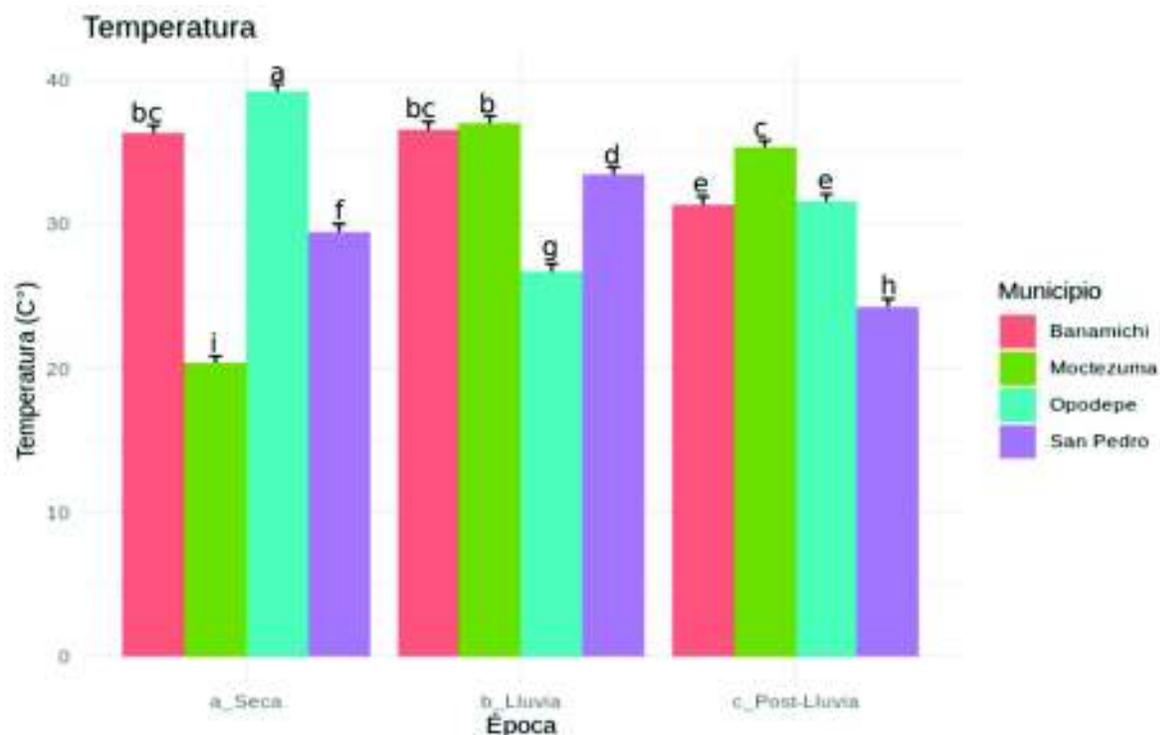


Figura 12. Determinación de Temperatura del suelo en 4 municipios del estado de Sonora en 3 diferentes épocas del año (Seca, lluvia y post-lluvia). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) prueba Tukey.

VI.3 Conductividad Eléctrica (dS/m)

La concentración de sales solubles presentes en la solución del sustrato se midió mediante Conductividad eléctrica (CE). La CE es la medida de la capacidad de un material para conducir la corriente eléctrica, el valor será más alto cuanto más fácil se mueve la corriente a través del mismo. Esto significa que, a mayor CE, mayor es la concentración de sales. Se recomienda que la CE de un sustrato sea baja, en lo posible menor a 1 dS m^{-1} (1+5 v/v) (Barbaro *et al.*, 2015).

Durante la época seca no se observaron diferencias significativas entre los municipios de Banámichi, Moctezuma y Opodepe, estos tres municipios si difirieron significativamente en cuanto al municipio de San Pedro. Se observó un rango de conductividad eléctrica (Tabla 12) que va de 0.48 dS/m asociado al municipio de Moctezuma a una conductividad eléctrica máxima de 1.16 dS/m presentada en el municipio de San Pedro (Figura 13).

Durante la época de lluvia, hubo diferencias significativas entre los cuatro municipios, se observó un rango de conductividad eléctrica (Tabla 10) de 0.70 dS/m asociado al municipio de Banámichi a una conductividad eléctrica máxima de 1.95 dS/m presentada en el municipio de San Pedro.

Durante la época post-lluvia, existieron diferencias significativas entre los cuatro municipios, se observó un rango de conductividad eléctrica (Tabla 10) que va de 0.42 dS/m asociado al municipio de Opodepe a una conductividad eléctrica máxima de 1.80 dS/m presentada en el municipio de Opodepe (Figura 13).

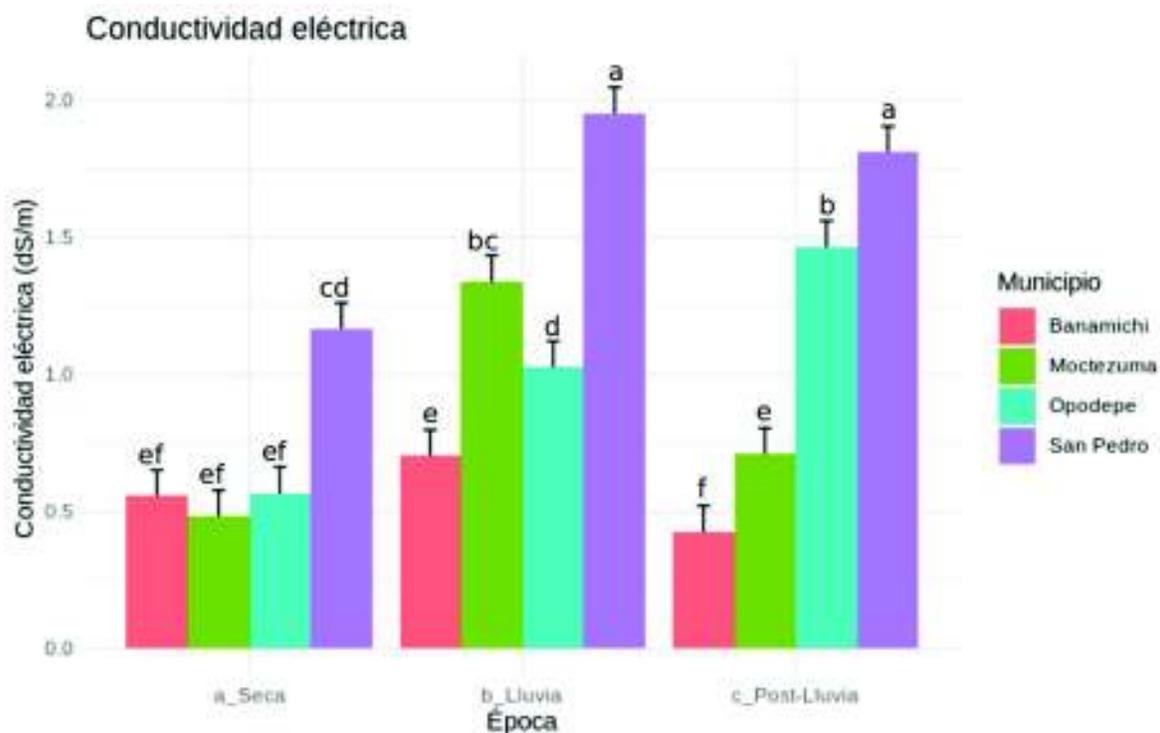


Figura 13. Determinación de Conductividad eléctrica del suelo en 4 municipios del estado de Sonora en 3 diferentes épocas del año (Seca, lluvia y post-lluvia). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) prueba Tukey.

En general se observó una tendencia al aumento de la conductividad eléctrica durante la época de lluvias (Figura 13), principalmente en el municipio de San Pedro ya que estas muestras de suelo son tomadas asociadas al cultivo de chiltepín, este incremento se debe por 1) la

presencia de fertilizantes insolubles, como los de liberación lenta, 2) la incorporación de una cantidad de fertilizante superior a las absorbidas o lixiviadas. (Barbaro *et al.*, 2015).

VI.4 Humedad

En otros ecosistemas áridos y semiáridos, Austin *et al.* (2004) asumen dinámicas similares dada la presencia de pulsos de precipitación como controladores principales de la humedad y cuando las temperaturas son más favorables para la actividad biológica, la humedad de suelo responde positivamente a los pulsos de precipitación, durante la época de mayor precipitación. En nuestro estudio, la mayor humedad superficial se presentó en Moctezuma durante la época de lluvia (21.02%). La menor humedad en el suelo fue en Opodepe durante la época post-lluvia (1.91%) (Figura 14).

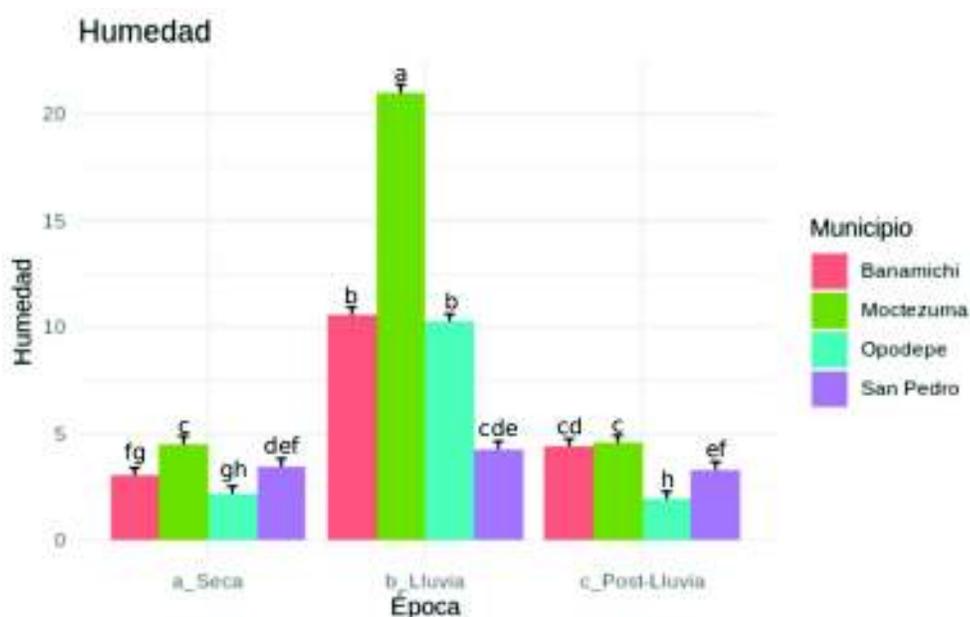


Figura 14. Determinación de humedad del suelo en 4 municipios del estado de Sonora en 3 diferentes épocas del año. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) prueba Tukey. Cada valor representa tres repeticiones en cada sitio de muestreo.

La precipitación pluvial y la temperatura son los principales factores que regulan el crecimiento de las plantas (Sala *et al.*, 1988; Loredó *et al.*, 2004), en especial en las zonas templadas y áridas, donde ambos factores marcan en los pastos un período de crecimiento bien

definido durante el año. La variación de las poblaciones de microorganismos asociadas con estos pastos responde predominantemente a los cambios de humedad del suelo, más que a las fluctuaciones de temperatura (Herman *et al.*, 1994; Loredó *et al.*, 2004).

VI.5 pH

Las unidades de pH indican la reacción del suelo. Un pH de siete significa que el suelo es químicamente neutral; valores más bajos significan que el suelo es ácido (con una excesiva concentración de iones hidrogenados (H^+) en el complejo de adsorción) y valores más elevados indican alcalinidad [una predominancia de calcio (Ca^{2+}) y/o de cationes de sodio (Na^+)] (FAO, 2002).

En los resultados obtenidos, se apreció que el pH del suelo asociado al chiltepín cultivado es de aproximadamente 9 en todas las épocas del año. Sin embargo, para Moctezuma en la época seca se apreció un pH de aproximadamente 7 y los dos periodos siguientes (lluvia y post-lluvia), el pH disminuyó a 6.7 aproximadamente. En el caso del municipio de Banámichi no se encontraron diferencias en el pH del suelo con respecto a las épocas del año muestreadas (Tabla 10). Sin embargo, el valor de pH más marcado fue en el Municipio de Opodepe con un pH de 8.37 en época seca, y disminuyó drásticamente hacia un pH ácido de 6.24 en la época de lluvia y volvió a aumentar en la época post-lluvia a un pH alcalino de 8.28. Lo que indica que las plantas de chiltepín pueden adaptarse a diferentes pH del suelo (Figura 15). Estudios previos han demostrado que los cambios en las comunidades microbianas del suelo a través del espacio a menudo están fuertemente relacionados con las diferencias en la química del suelo. En particular, se ha demostrado que la composición y en algunos casos la diversidad de las comunidades bacterianas del suelo, a menudo está fuertemente correlacionada con el pH del suelo. Este patrón es válido tanto para la composición general de la comunidad bacteriana como para la composición de grupos bacterianos individuales (Frey *et al.*, 2004; Fierer *et al.*, 2006; Nilsson *et al.*, 2007; Hartman *et al.*, 2008; Lauber *et al.*, 2008; Jenkins *et al.*, 2009; Baker *et al.*, 2009; Lauber *et al.*, 2009).

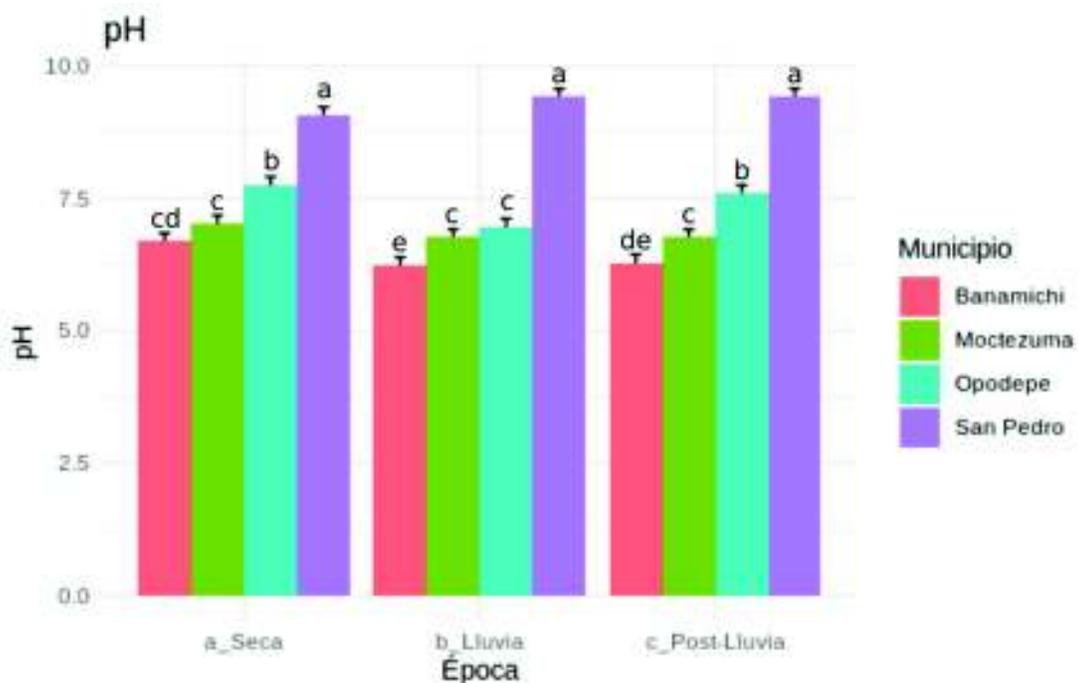


Figura 15. Determinación de pH del suelo en 4 municipios del estado de Sonora en 3 diferentes épocas del año (seca, lluvia y post-lluvia). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) prueba Tukey.

En la Figura 15 se observa el cambio temporal del pH en suelo asociados a la planta de chiltepín. En el pH asociado a las muestras de suelo del chiltepín silvestre (Banámichi, Moctezuma y Opodepe) se ve una tendencia notable hacia un pH más ácido, disminuyendo aún más durante la época de lluvias, comparándolo con el pH encontrado en San Pedro; suelo asociado al chiltepín cultivado, que sigue una tendencia alcalina, aumentando durante las épocas con mayor humedad.

VI.6 Nitrógeno Inorgánico en Suelo

Los microorganismos responden rápidamente a la disponibilidad de humedad en el suelo, aun cuando sólo sea un evento pequeño que solo humedezca la parte superficial del suelo, esto lleva a que el nitrógeno disponible se acumule en la época seca cuando las plantas no pueden utilizarlo (Austin *et al.*, 2004). Durante períodos de sequía, los microorganismos del suelo incorporan solutos para ajustarse osmóticamente a la ausencia de agua en el suelo, inmovilizando nutrientes

disponibles en el medio. La capacidad de aclimatación a los pulsos de agua y pulsos de humedad–sequedad puede variar entre microorganismos (Schimel *et al.*, 2007).

Cuando los periodos de sequía son muy prolongados, al humedecerse se presenta un estrés fisiológico para las comunidades microbianas superficiales y pueden inducir la ruptura de la pared celular y muerte de biomasa microbiana. Al rehumedecer, se produce un shock osmótico microbiano que induce la lisis de las células con la liberación de solutos intracelulares, estos sustratos lábiles de carbono y nitrógeno pueden ser mineralizados rápidamente por los microorganismos sobrevivientes (Fierer *et al.*, 2003). Por otra parte, los pulsos de secado y humedecimiento del suelo pueden causar la ruptura de agregados, permitiendo a los descomponedores de la materia orgánica acceder a ella (Lundquist *et al.*, 1999).

VI.7 Amonio

La fijación biológica del nitrógeno atmosférico es llevada a cabo por microorganismos que tienen la capacidad de reducir el nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_4^+), mismo que puede ser utilizado por las plantas (Mantilla-Paredes *et al.*, 2009).

Los resultados mostraron que existen diferencias significativas entre municipios, pero no entre épocas del año, como se observa en la Figura 16. Para el municipio de Banámichi, durante la época de lluvias, la concentración de amonio aumenta y disminuye durante la época post-lluvia; siendo esta tendencia muy parecida en los diferentes municipios analizados y sin cambios significativos. Se obtuvo en general un rango de 0.25 mg/kg encontrado en el municipio de San Pedro en época de lluvia, a un mínimo de 0.065 mg/kg en el municipio de Moctezuma en época seca.

La nitrificación es frecuentemente limitada por la disponibilidad de amonio, también puede ser muy baja o ausente en la presencia de especies con altas concentraciones de compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos pueden tener diferentes efectos sobre el ciclo del nitrógeno (Horner *et al.*, 1988). La disminución de la tasa de nitrificación puede ser debida a la disminución en la disponibilidad de amonio impuesta por los compuestos fenólicos o, al incremento en la inmovilización microbiana de nitrógeno a través del uso de compuestos fenólicos como sustratos de carbono (Schimel *et al.*, 1996).

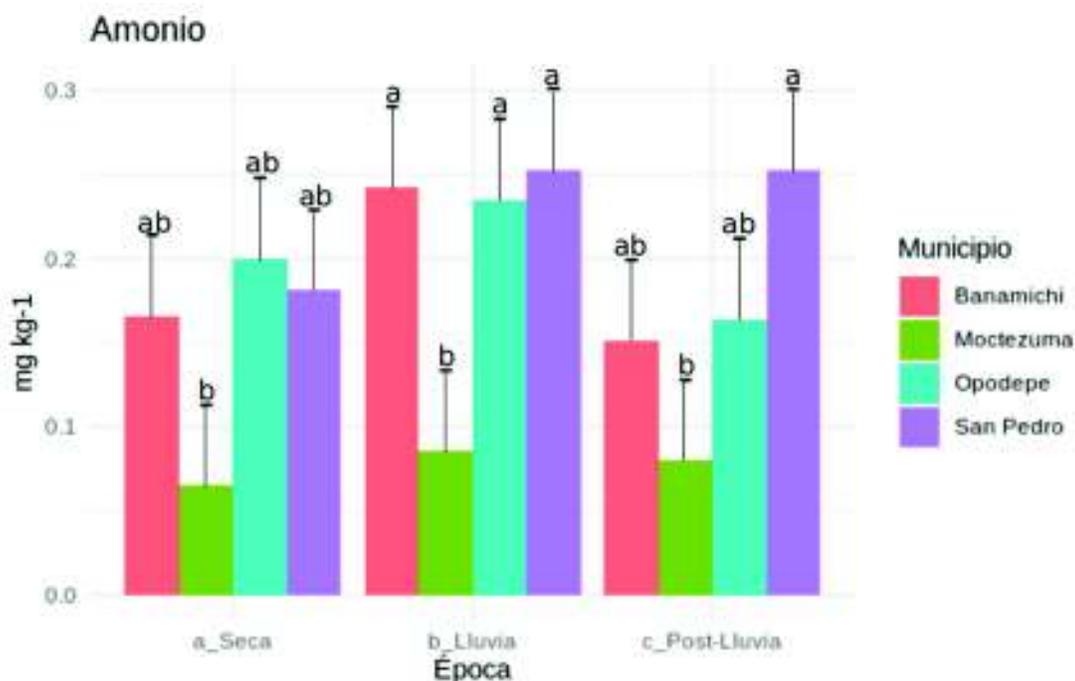


Figura 16. Determinación de Amonio del suelo en 4 municipios del estado de Sonora en 3 diferentes épocas del año (seca, lluvia y post-lluvia). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) prueba Tukey.

VI.8 Nitrito

En cuanto a la determinación de nitrito se puede observar en la Figura 17 que existen diferencias significativas entre el municipio de Opodepe durante la época de lluvias, en comparación con los demás municipios a través de las diferentes épocas del año. Obteniendo un rango de 0.11 mg/kg en Banamichi en la época post-lluvia a 4.75 mg/kg en Opodepe en la época de lluvia.

El nitrógeno orgánico del suelo que es liberado a formas inorgánicas (amonio y nitrato) por los microorganismos del suelo, se denomina mineralización (Binkley y Hart, 1989). El primer producto de la mineralización es el amoniaco (NH_3); en el suelo este producto puede adquirir un hidrogeno y formar amonio (NH_4^+) mediante el proceso de amonificación, que puede ser fijado por las arcillas del suelo o por la materia orgánica, volatilizado como amoniaco, asimilado por plantas o microorganismos (Philippot y Germon, 2005), lixiviado u oxidado por bacterias autotróficas mediante el proceso de nitrificación, en donde pierde dos átomos de hidrogeno para formar nitrito y luego nitrato (NO_3^-). Parte de estas formas inorgánicas son

tomadas por los microorganismos incorporándolas a su biomasa y es llamada inmovilización. El nitrato puede pasar al proceso de desnitrificación donde se convierte en óxido nitroso (N₂O) y nitrógeno (N₂) elemental (Binkley y Vitousek, 1989).

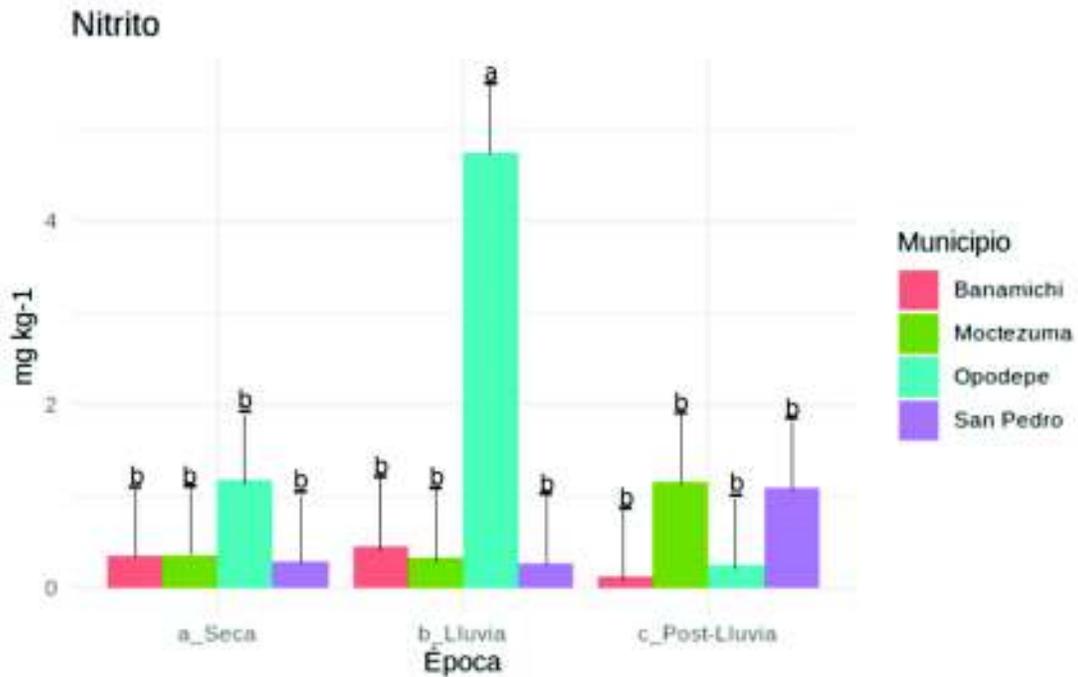


Figura 17. Determinación de Nitrito del suelo en 4 municipios del estado de Sonora en 3 diferentes épocas del año (seca, lluvia y post-lluvia). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) prueba Tukey.

VI.9 Nitrato

En la determinación de nitrato en los diferentes municipios y épocas del año analizadas, se encontró en poca cantidad; siendo la mínima de 0.13 mg/kg de suelo perteneciente al municipio de San Pedro en la época post-lluvia y la máxima de 0.52 mg/kg de suelo perteneciente al municipio de Opodepe en la época seca. Entre todos los municipios en las diferentes épocas se puede observar la diferencia significativa que hay entre el municipio de Opodepe en época seca y San Pedro en época post-lluvia (Figura 18).

La presencia de arboles nodrizas en el desierto Sonorense, favorece la formación de suelos más fértiles bajo su dosel al incrementar la cantidad de nitrógeno. En la parte de

California, se encontraron cantidades muy elevadas de nitrato bajo el dosel de mezquite por la disminución de procesos de lixiviación y desnitrificación debido a la aridez (Virginia y Jarrell, 1983).

La desnitrificación es un proceso anaeróbico que lo llevan a cabo bacterias, principalmente, algunos hongos y levaduras (Van Spanning *et al.*, 2005) y que consiste en la reducción microbiana de nitrato (NO_3) ó nitrito (NO_2) a óxido nitroso (N_2O) ó nitrógeno elemental (N_2). Este proceso es afectado por la inmovilización microbiana, al humedecerse el suelo y en presencia de carbono, los microorganismos incorporan nitrógeno a su biomasa; sin embargo, en suelos bajos en nutrientes se presentan altas tasas de desnitrificación similares a la de suelos de regiones templadas y tropicales, posiblemente debido a los pulsos de secado-humedecimiento en los desiertos (Peterjohn y Schlesinger, 1991), por lo cual cobra especial importancia la presencia de vegetación que aporten carbono al suelo y favorezcan la conservación de nitrógeno en el suelo por inmovilización en biomasa microbiana. La inmovilización microbiana de nitrógeno es un proceso importante documentado en el suelo del Desierto Chihuahuense (Fisher *et al.*, 1987).

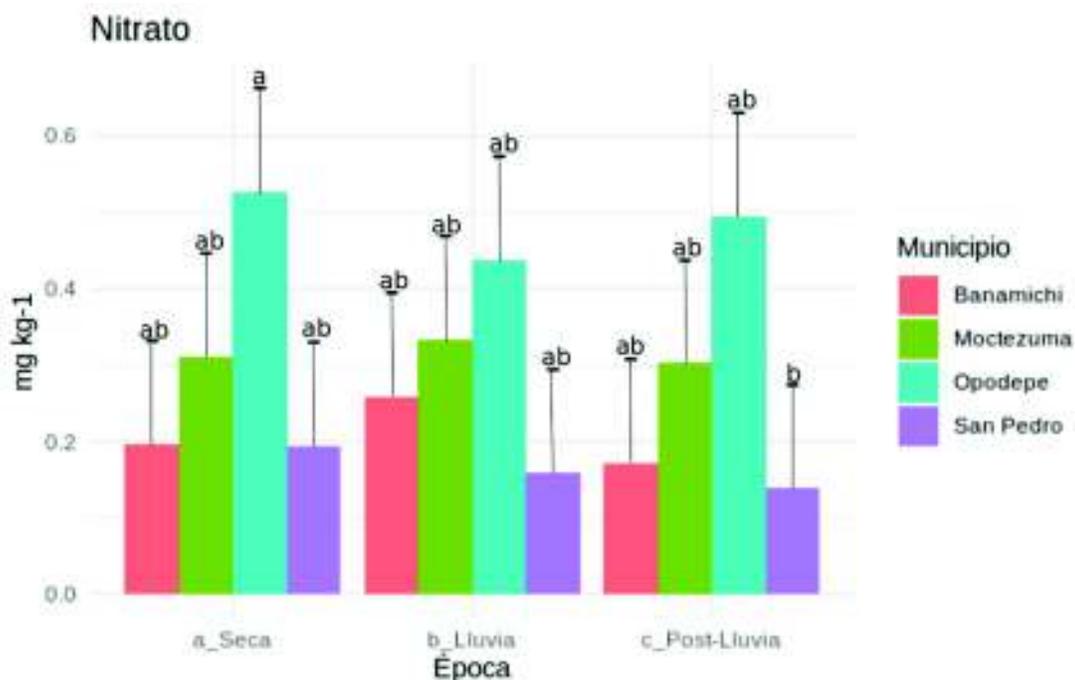


Figura 18. Determinación de Nitrato del suelo en 4 municipios del estado de Sonora en 3 diferentes épocas del año (seca, lluvia y post-lluvia). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) prueba Tukey.

VI.10 Bacterias Cultivables

Se encontró que las UFC, estuvieron en un rango de 1.21×10^4 a 5.31×10^9 , en raíces de chiltepín, con diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los sitios de muestreo en base a la prueba de Tukey (Figura 19). En el municipio de Banámichi en la época de post-lluvia y en San Pedro en la época seca, se registró la mayor densidad de rizobacterias, mientras que en los sitios de Opodepe y Banámichi durante la época post-lluvia presentaron una menor cantidad de rizobacterias aisladas.

Las BPCV son mayoritariamente organismos del suelo y de la rizosfera que son capaces de colonizar las raíces de las plantas en números significativos (10^5 - 10^7 UFC por gramo de raíz fresca) e influyen en el crecimiento de las plantas de una manera positiva bajo ciertas condiciones ambientales y del suelo (Bulgarelli *et al.*, 2013). En relación a los resultados obtenidos de densidad de bacterias a través de las UFC no excedieron $5.31 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$. Lo que es común en poblaciones de bacterias en la rizosfera de plantas (Krishna *et al.*, 2012). El-Deeb *et al.* (2013) encontraron que la población de bacterias en rizosfera en condiciones ambientales de plantas de zonas desérticas son más altas ($5.2 \times 10^6 \text{ UFC g}^{-1}$) en comparación con plantas que crecen en otras condiciones endófitas (organismos que viven dentro de una planta sin que importara la relación que guardan con ella) ($1.1 \times 10^2 - 1.5 \times 10^2 \text{ UFC g}^{-1}$). De igual manera en este estudio la abundancia de bacterias fue diferente en cada uno de los sitios de muestreo, lo cual puede deberse a que en cada uno de los sitios de muestreo las variables ambientales y físico-químicas del suelo fueron diferentes; y de acuerdo con Andrew *et al.*, (2012), variables ambientales y tipo de suelo tienen una fuerte influencia en la abundancia y la composición de bacterias rizosféricas de las plantas.

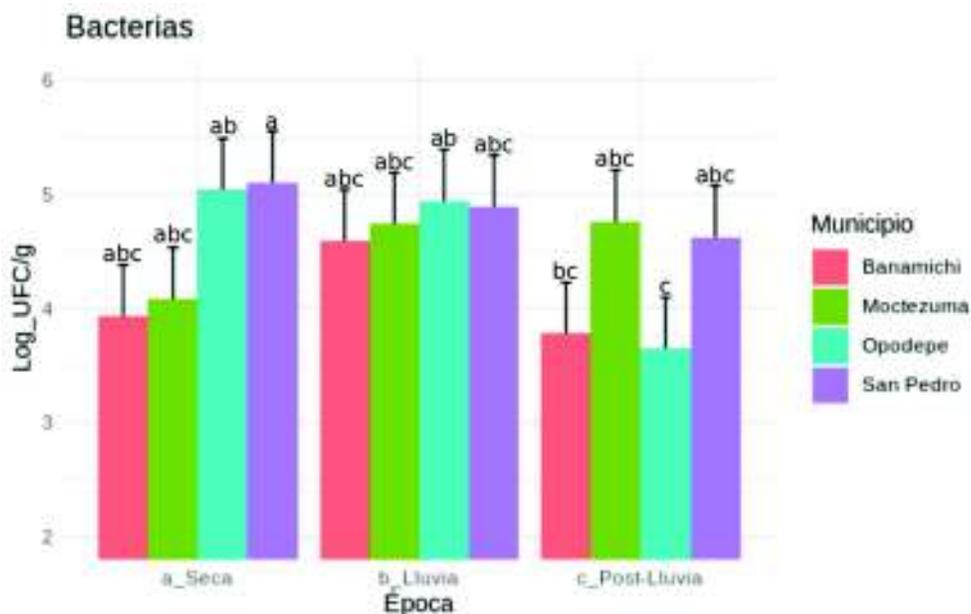


Figura 19. Unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de suelo de población de bacterias rizosféricas, durante las diferentes épocas del año en cuatro municipios de Sonora. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) prueba Tukey. Cada valor representa tres repeticiones en cada sitio de muestreo.

VI.11 Correlación de los Análisis Físico-químico del Suelo con Respecto a la Temporada y Ubicación de Muestreo

Las dos primeras dimensiones del PCA explicaron el 36.84% de la variación total, con el 20.64% y el 16.2% representando el componente 1 y el componente 2 respectivamente (Figura 20). En este análisis podemos ver la correlación que existe entre los parámetros fisicoquímicos en los cuatro municipios en los que se realizó el análisis de suelo asociado al chiltepín, a través de las épocas del año, podemos decir que no existe correlación alguna referente al parámetro de nitrato con los demás parámetros analizados, esta determinación, se correlaciona con el municipio de Moctezuma durante la época seca, existe una mayor dispersión de los puntos formando dos conjuntos separados, donde la temperatura, humedad y amonio, se correlacionan con Moctezuma durante la época de lluvia y post-lluvia, Banámichi también mantienen la misma tendencia de puntos mas dispersos en los cuales, se correlaciona los parámetros de amonio y nitrato. Siguiendo esta tendencia muy marcada es la del pH con la localidad de San Pedro durante las tres épocas evaluadas, en el municipio de Opodepe podemos observar una agrupación hacia

el Centro de los ejes, lo que nos dice que no hay mucha contribución de los parámetros medidos en este municipio a través de las épocas.

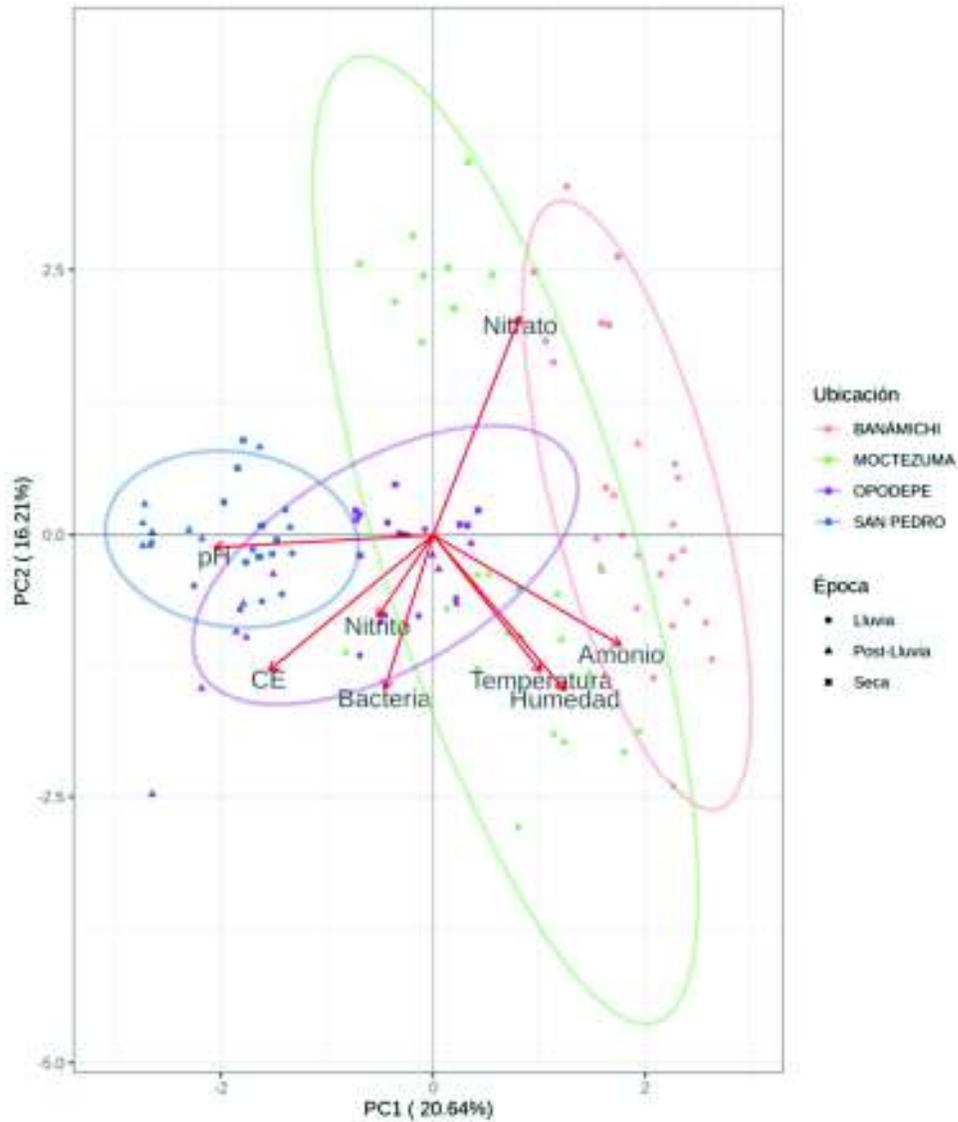
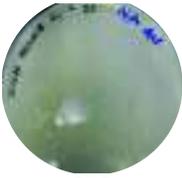


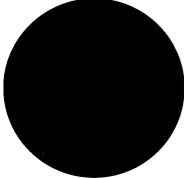
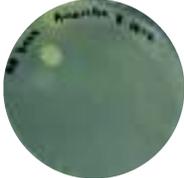
Figura 20. Análisis de componentes principales (PCA), entre factores ambientales, ubicación y estaciones del año presentes en el suelo de la rizosfera de Chiltepin (*C. annuum L. var. glabriusculum*), los parámetros incluyen temperatura, humedad, bacterias UFC, conductividad eléctrica (CE), pH y nitrógeno inorgánico como amonio, nitrito, nitrato.

VI.12 Aislamiento y Caracterización Metabólica de Bacterias

Se aislaron 241 cepas bacterianas de las cuales se seleccionaron 37 cepas bacterianas representativas del total de aislados, mediante la descripción fenotípica macroscópica y la pigmentación de las UFC de cada cultivo puro sembrado en placas Petri con agar nutritivo (Tabla 11).

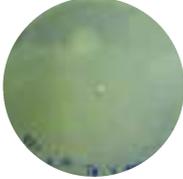
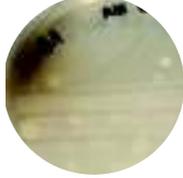
Tabla 11. Descripción fenotípica macroscópica de las UFC de 37 aislados bacterianos de interés.

ID Cepa	Características macroscópicas	
1SP1A	Superficie plana, borde irregular, color amarillo claro, opaca.	
6SP1A	Superficie plana, borde regular, color blanco, opaca.	
10SP1C	Superficie plana, borde irregular, color amarillo claro, opaca.	
1SP2C	Superficie lisa, borde regular, color rosa claro dependiente de temperatura, opaco	
2SP2C	Superficie plana, borde irregular, color amarillo claro, opaca.	
3SP2A	Superficie plana, borde irregular, color amarillo claro, opaca.	

4SP2A	Superficie plana, borde irregular, color blanco, opaca.	
2SP3A	Superficie plana, borde irregular, color amarillo claro, opaca.	
3SP3A	Superficie plana, borde irregular, color amarillo claro, opaca.	
4SP3A	Superficie plana, borde irregular, color amarillo claro, opaca.	
ID Cepa	Características macroscópicas	
5SP3A	Superficie plana, borde regular, color blanca, opaca.	
1OP1D	Superficie convexa, borde irregular, color amarillo claro.	
7OP1A	Superficie plana, borde irregular, color amarillo fluorescente, translucida.	
9OP1D	Superficie plana, borde irregular, color amarillo claro, opaco.	
1OP2B	Superficie rugosa, borde irregular, color amarillo claro, opaca.	

2OP2C	Superficie convexa, borde irregular, color amarillo claro.	
3OP2C	Superficie plana, borde irregular, color amarillo claro, opaca.	
4OP2B	Superficie lisa, borde regular, color rosa claro dependiente de temperatura, opaco	
11OP2D	Superficie plana, borde regular, color amarillo, opaca.	
28OP2A	Superficie corrugada, borde irregular, color amarillo, translucida.	

ID Cepa	Características macroscópicas	
32OP2D	Superficie plana, borde irregular, color amarillo claro, opaca.	
1OP3A	Superficie convexa, borde regular, color amarillo, opaca	
10OP3B	Superficie plana, borde irregular, color amarillo claro, opaca.	

11OP3B	Superficie plana, borde irregular, color amarillo claro, opaca.	
19OP3B	Superficie rugosa, borde irregular, color amarillo claro, translucida.	
1BAN1C	Superficie convexa, borde irregular, color amarillo claro.	
4BAN2A	Superficie plana, borde irregular, color amarillo claro, opaca.	
7BAN2B	Superficie plana, borde regular, color oscuro, translucida.	
2BAN2A	Superficie convexa, borde irregular, color amarillo claro.	
21BAN2A	Superficie plana, borde irregular, color amarillo claro, opaca.	

ID Cepa	Características macroscópicas	
1BAN3A	Superficie plana, borde irregular, color amarillo claro, opaca.	
3BAN3A	Superficie plana, borde irregular, color amarillo claro, opaca.	
19BAN3C	Superficie plana, borde regular, color amarillo Traslúcida.	
3MOC2A	Superficie plana, borde regular, color amarillo, opaca.	
6MOC2A	Superficie convexa, borde regular, color amarillo, opaca.	
10MOC2B	Superficie plana, borde regular, color verde fluorescente, transparente.	
12MOC2B	Superficie lisa, borde irregular, color rosa, opaco	

VI.12.1 Evaluación *in vitro* de propiedades promotoras del crecimiento vegetal

VI.12.2 Solubilización de fósforo

Para determinar la capacidad de las 37 cepas para solubilizar fosfato se utilizó un medio que contenía Sales Pikovskaya como fuente de fósforo. Los 37 aislamientos bacterianos crecieron bien en este medio de los cuales 30 formaron un halo de solubilización alrededor de las colonias (Figura 21), de las cuales las cepas 4BAN2A, 1BAN3A y 1SP1A presentaron el mayor índice de eficiencia de solubilización con valores de IES de 8.57, 6.22 y 6.67, respectivamente (Figura 22). Las cepas 6SP1A, 10SP1C, 2SP2C, 1OP1D, 11OP3B, 19OP3B y 21BAN2A no mostraron halo de solubilización.

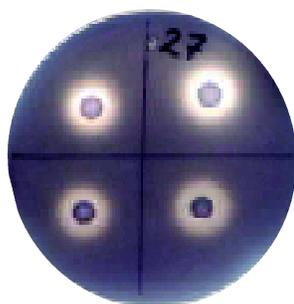


Figura 21. Halo de solubilización de fosfatos producido por la cepa 4BAN2A correspondiente al Municipio de Banámichi durante la época de lluvia.

Solubilización de fosfatos por bacterias

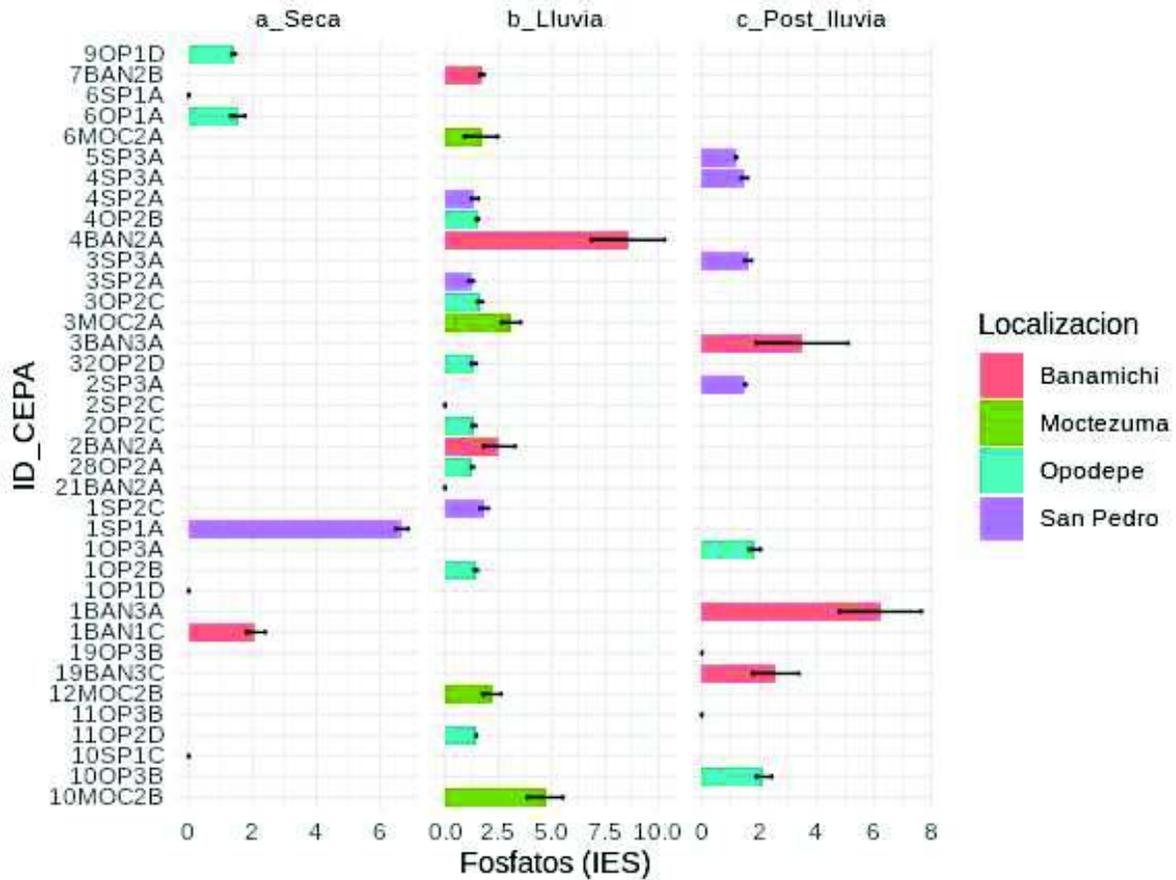


Figura 22. Determinación del índice de eficiencia de solubilización de fosfato en 37 bacterias aisladas.

En general, el mecanismo bacteriano que más se asocia a la solubilización de fósforo inorgánico es la biosíntesis de ácidos orgánicos; los cuales disminuyen el pH o actúan como agentes quelantes. Nuestros resultados evidenciaron una capacidad intrínseca de las cepas en estudio para disminuir el pH del medio de cultivo lo cual puede ser explicado por las razones mencionadas previamente o por la extrusión de protones los cuales tienen un efecto similar (Reyes *et al.*, 1999; Delvasto *et al.*, 2008). La síntesis de ácidos orgánicos suele estar asociada al metabolismo de algunos carbohidratos, por ejemplo, glucosa; ésta suele ser metabolizada vía glucólisis y ciclo de Krebs lo cual da lugar a la generación de ácidos intermediarios los cuales pueden ser excluidos al medio con efectos directos sobre la biodisponibilidad de nutrientes poco

solubles y el pH (Gunnarsson *et al.*, 2004). Varios autores han reportado microorganismos pertenecientes a estos géneros con capacidades importantes de solubilización, aún más los datos reportados son congruentes con los obtenidos en este estudio; evidenciando además un importante potencial de éstos para la solubilización *in vitro* de P inorgánico. Seshadri y Ignacimuthu (2002) reportaron índices de solubilización de 2.05 ± 4.11 por *Pseudomonas sp.* y 1.84 ± 4.43 por *Bacillus sp.* en agar Pikovskaya. De igual forma, Hariprasad y Niranjana en 2009, reportaron índices de solubilización de 1.9 ± 0.0089 por *Enterobacter sp.*; 1.5 ± 0.063 por *Bacillus subtilis* y 2.4 ± 0.033 por *Pseudomonas putida* en medio Pikovskaya. La capacidad bacteriana para solubilizar fósforo, como se mencionó previamente, está determinada por la capacidad de ciertos microorganismos para liberar metabolitos tales como ácidos orgánicos de bajo peso molecular o ciertas enzimas, las cuales pueden liberar fósforo a partir de formas orgánicas de este. Ambas estrategias redundan en un aumento en la biodisponibilidad de fósforo en la rizósfera, el cual puede ser asimilado por las plantas (Sagoe *et al.*, 1998). Muchos géneros bacterianos han sido ampliamente reportados por su capacidad para mineralizar o solubilizar fuentes orgánicas o inorgánicas de fósforo, respectivamente. En particular, se ha evidenciado que estas BPCV pueden actuar como agentes quelantes debido a la presencia de muchos grupos carbonilo, lo que les permite formar compuestos de quelantes con cationes polivalentes como calcio, magnesio, hierro (II o III), entre otros, los cuales se encuentran asociados a iones ortofosfato en la mayor parte de los casos. En suelo, la síntesis de estos ácidos no provoca un cambio en el pH del suelo, sino que logra la generación de microambientes acídicos en los cuales la disponibilidad de P es mayor (Rodríguez *et al.*, 2000).

VI.12.3 Producción de sideróforos

La producción de sideróforos se realizó en el medio CAS. Un total de 17 cepas de bacterias, formaron un halo alrededor de las colonias en este medio (Figura 23), por lo que se considera como producción de sideróforo positiva (Figura 26).

La síntesis microbiana de sideróforos está asociada con el aumento en la captación de hierro, lo cual puede asociarse a una mejor atracción de ese mismo elemento por las plantas y a la protección de éstas al ataque de algunos patógenos. En la mayor parte de suelos este elemento

es restrictivo debido a su baja biodisponibilidad por precipitación o quelación. Para evaluar la capacidad de las bacterias del presente estudio que pudieran tener la capacidad de sintetizar sideróforos, los cuales son moléculas orgánicas con una alta afinidad para la quelación de cationes polivalentes; se empleó la técnica de medición de sideróforos basada en la utilización del compuesto “Chrome Azurol Sulfonato” (CAS) el cual tiene la capacidad de formar un complejo CAS-Fe, que posee un color azul a pH cercano a 5.6. Cuando la bacteria crece sobre el medio CAS, la disponibilidad de Fe para ésta disminuye drásticamente debido a que la mayor parte se encuentra quelado al CAS. La bacteria pueda tomar el Fe sintetizando éstas moléculas denominadas sideróforos, los cuales tienen mayor afinidad por el Fe que el mismo CAS, cuando el complejo se disocia se genera un cambio en la coloración del medio de cultivo el cual es indicativo de la capacidad bacteriana para sintetizar sideróforos. Las cepas 10OP3B, 19BAN3C, 10MOC2B y 1OP1D mostraron valores de eficiencia de producción de sideróforos (2.16, 1.59, 1.51 y 1.38) respectivamente; éstas fueron capaces de producir este grupo de compuestos y presentaron el mayor índice de eficiencia de producción (Figura 17). Las cepas 6SP1A, 10SP1C, 2SP2C, 1OP1D, 11OP3B, 19OP3B y 21BAN2A no mostraron halo de producción.

La producción de sideróforos es beneficiosa para las plantas (suministra directamente hierro a las plantas) y está implicada en la supresión de enfermedades transmitidas por el suelo (reducen la competitividad de patógenos) (Tank *et al.*, 2012). En estudios presentado por Patil *et al.* un mutante d *P. putita* que sobreexpresan sideróforos fue más efectivo contra el marchitamiento por *Fusarium* en tomate en comparación con un mutante de *P. aeruginosa* deficiente en sideróforos que perdió su capacidad de control biológico. Además, los sideróforos producidos por *B. subtilis* exhiben efectos antagónicos contra hongos que marchitan y secan la raíz en los garbanzos (Patil *et al.*, 2014).



Figura 23. Halo alrededor de la colonia indica que la bacteria produce sideróforos. Cepa 10OP3B correspondiente al municipio de Opodepe durante la época de post-lluvia.

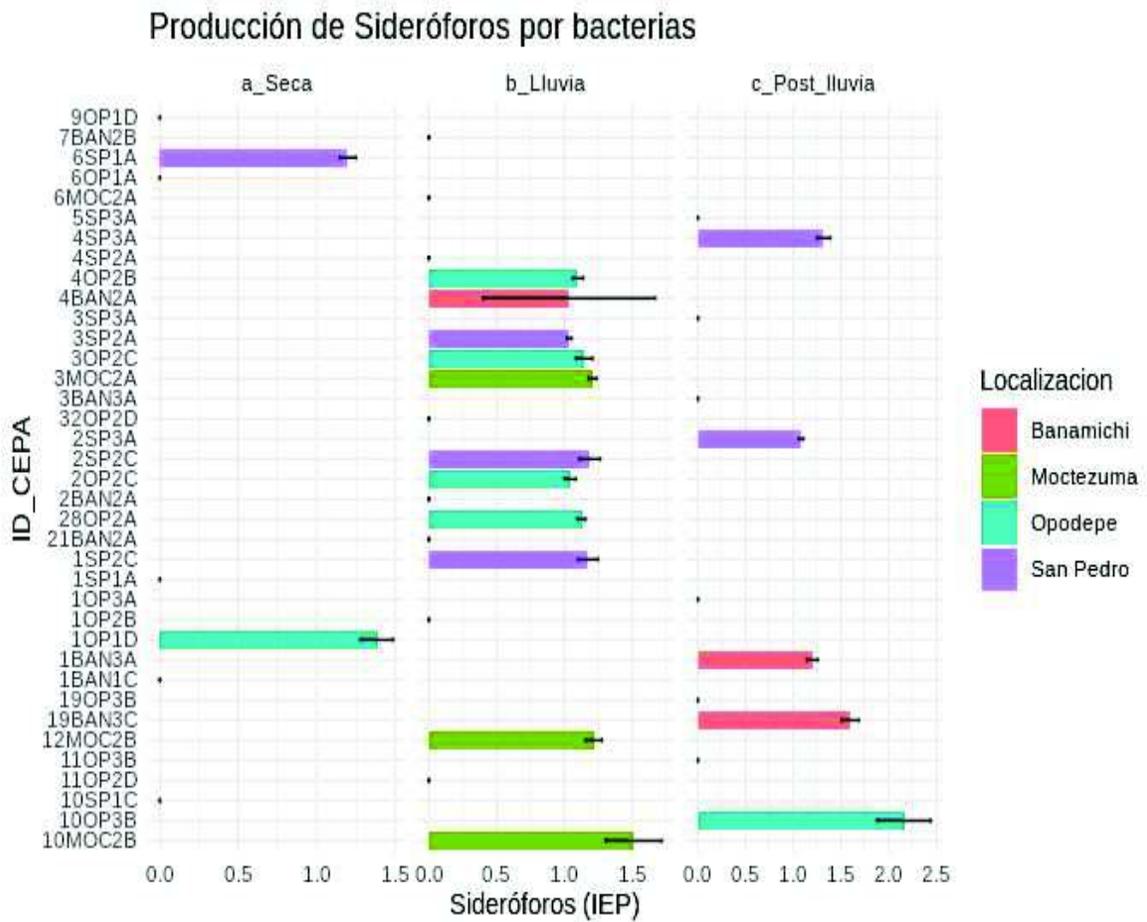


Figura 24. Valores de producción de sideróforos en las cepas aisladas en el presente estudio.

VI.12.4 Determinación de la capacidad de producir ácido indolacético (AIA)

Para determinar la capacidad de las cepas para producir ácido indolacético (AIA) se utilizó un medio suplementado con L-triptófano. Los 37 aislamientos bacterianos tuvieron buen crecimiento en este medio. Las cepas 10SP1C, 4SP2A, 2BAN2A, 19OP3B, 10OP3B y 1SP2C presentaron valores de AIA de 12.16, 10.86, 9.65, 9.55, 9.51 y 9.38 ppm respectivamente. Por lo que se observa la cepa 10SP1C presentó la mayor producción de AIA (Figura 25) mientras que las cepas 10MOC2B y 19BAN3C mostraron la menor producción (5.91 ppm de AIA).

Al evaluar la producción de compuestos indólicos, se observó un comportamiento similar en la mayoría de cepas evaluadas. En general, se ha sugerido que la producción de auxinas por las bacterias, especialmente ácido 3-indolacético han influido significativamente sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas (Patriquin, 1985). Varios estudios han demostrado que la producción *in vitro* de AIA y otras hormonas fisiológicamente activas derivadas del L-triptófano, son una característica de las cepas BPCV (Tien *et al.*, 1979; Jain y Patriquin, 1985).

Ali *et al.* (2009) realizaron análisis colorimétricos a cultivos bacterianos en fase estacionaria e indicaron que diferentes aislamientos de *Bacillus sp.* variaron en su capacidad para producir auxinas en presencia y en ausencia de L-triptófano. Las cepas que producían bajos niveles de AIA en ausencia de L-triptófano, al aumentar las concentraciones de este compuesto (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de triptófano), aumentaban la producción de AIA en rangos que oscilaban entre $19.6 \pm 0.7 \mu\text{g}/\text{mL}$ y $21 \pm 0.6 \mu\text{g}/\text{mL}$. Es importante resaltar que en el presente ensayo se utilizaron concentraciones más bajas de triptófano (100 ppm) para evaluar la producción de AIA, lo cual permite afirmar que las cepas evaluadas pueden ser consideradas como promotoras del crecimiento vegetal por su alta síntesis de AIA.

Producción de ácido indolacético (AIA) por bacterias

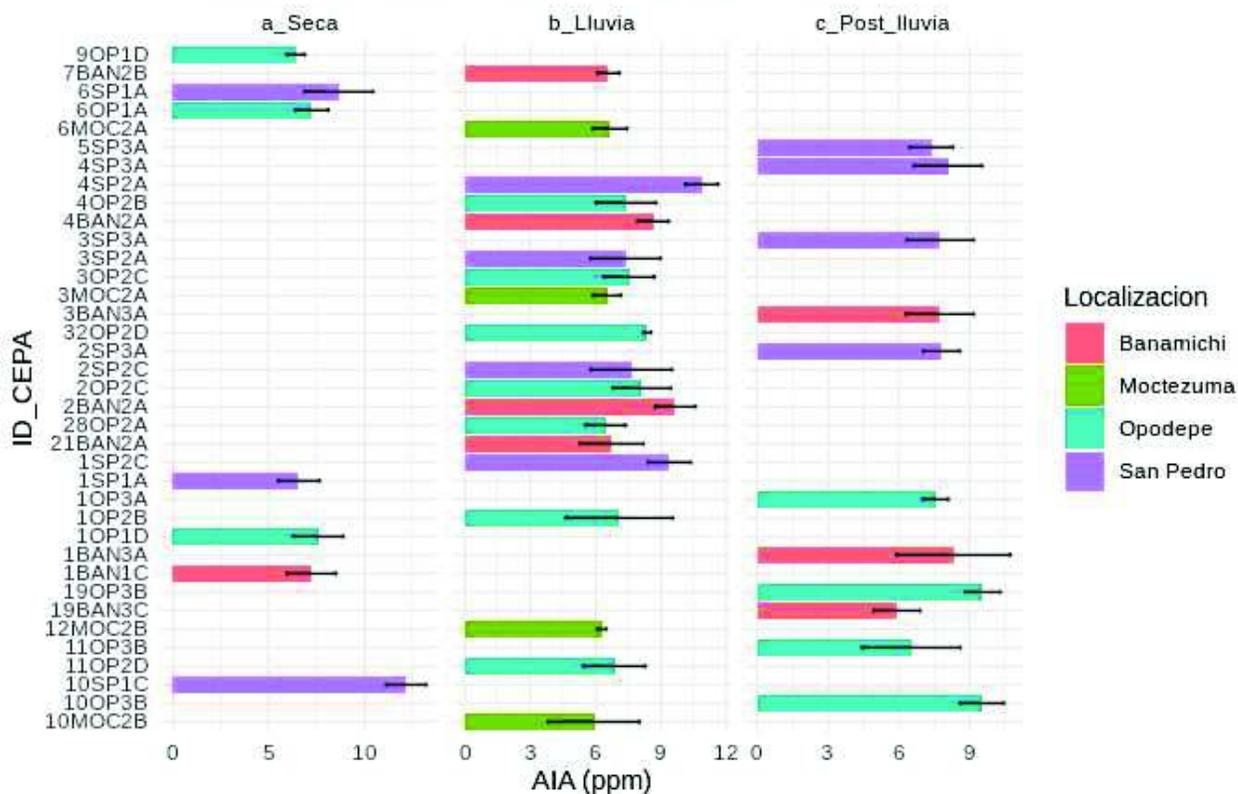


Figura 25. Valores de producción de ácido indolacético en las cepas aisladas en el presente estudio.

VI.12.5 Análisis de las 37 cepas aisladas en base a los tres mecanismos promotores de crecimiento vegetal (producción de sideróforos, solubilización de fosfato y producción de ácido indolacético)

Los resultados obtenidos de la caracterización metabólica de las 37 cepas bacterianas elegidas, mostraron que todas las cepas presentaban los al menos uno de los tres mecanismos promotores del crecimiento vegetal evaluados (producción de sideróforos, solubilización de fosfato y producción de ácido indolacético) (Tabla 14).

Una vez realizado los análisis anteriormente mencionados como se muestra en la Tabla 14, se procedió a seleccionar las cepas bacterianas que presentaron los tres mecanismos de crecimiento vegetal evaluados, obteniendo 14 cepas bacterianas de interés (1SP2C, 3SP2A,

2SP3A, 4SP3A, 2OP2C, 3OP2C, 4OP2B, 10OP3B, 4BAN2A, 1BAN3A, 19BAN3C, 3MOC2A, 10MOC2B y 12MOC2B).

Tabla 12. Resultado de los tres mecanismos promotores del crecimiento vegetal (producción de sideróforos, solubilización de fosfato y producción de ácido indol acético) que se realizaron a las 37 cepas bacterianas con posibles propiedades promotoras del crecimiento vegetal.

ID_CEP	Índoles (ppm)	Fosfatos (IES)	Sideróforos (IEP)	Época	Localización
1SPTA	x	x		Seca	San Pedro
6SP1A	x		x	Seca	San Pedro
10SP1C	x			Seca	San Pedro
1SP2C	x	x	x	Lluvia	San Pedro
2SP2C	x		x	Lluvia	San Pedro
3SP2A	x	x	x	Lluvia	San Pedro
4SP2A	x	x		Lluvia	San Pedro
2SP3A	x	x	x	Post_lluvia	San Pedro
3SP3A	x	x		Post_lluvia	San Pedro
4SP3A	x	x	x	Post_lluvia	San Pedro
5SP3A	x	x		Post_lluvia	San Pedro
1OP1D	x		x	Seca	Opodepe
6OP1A	x	x		Seca	Opodepe
9OP1D	x	x		Seca	Opodepe
1OP2B	x	x		Lluvia	Opodepe
2OP2C	x	x	x	Lluvia	Opodepe
3OP2C	x	x	x	Lluvia	Opodepe
4OP2B	x	x	x	Lluvia	Opodepe
11OP2D	x	x		Lluvia	Opodepe

28OP2A	x	x		Lluvia	Opodepe
32OP2D	x	x		Lluvia	Opodepe
1OP3A	x	x		Post_lluvia	Opodepe
10OP3B	x	x	x	Post_lluvia	Opodepe
11OP3B	x			Post_lluvia	Opodepe
19OP3B	x			Post_lluvia	Opodepe
1BAN1C	x	x		Seca	Banamichi
4BAN2A	x	x	x	Lluvia	Banamichi
7BAN2B	x	x		Lluvia	Banamichi
2BAN2A	x	x		Lluvia	Banamichi
21BAN2A	x			Lluvia	Banamichi
1BAN3A	x	x	x	Post_lluvia	Banamichi
3BAN3A	x	x		Post_lluvia	Banamichi
19BAN3C	x	x	x	Post_lluvia	Banamichi
3MOC2A	x	x	x	Lluvia	Moctezuma
6MOC2A	x	x		Lluvia	Moctezuma
10MOC2B	x	x	x	Lluvia	Moctezuma
12MOC2B	x	x	x	Lluvia	Moctezuma

VI.13 Correlación entre los tres mecanismos promotores del crecimiento vegetal evaluados (producción de sideróforos, solubilización de fosfato y producción de ácido indol acético)

Para determinar la correlación estadística entre las tres características de BPCV, se utilizó un PCA. Las dos primeras dimensiones de PCA explicaron el 70.9% de la variación total, con el 36.2% y el 34.9% representando el componente 1 y el componente 2 respectivamente (Figura 26). De acuerdo con la Figura 3, los tres vectores aumentaron hacia los valores positivos de la primera dimensión (eje X). Los tres vectores: solubilización de fosfato producción de Ácido

indolacético y producción de sideróforos no presentaron correlación entre si. Los diferentes aislamientos bacterianos forman un grupo, el cuál se asoció con la actividad y la producción de compuestos indólicos y la producción de sideróforos y la capacidad de solubilización de fosfato. Se observan algunas cepas que se alejan de este grupo como la cepa 8 (10OP3B) referente a la bacteria identificada como *Bacillus velezensis* FZB42, la cual es la cepa encontrada en el municipio de Opodepe durante la época Post-Lluvia, fué la más cercana a la producción de sideróforos, en cuanto a la cepa 1 (1SP2C) referente a *Serratia nematodiphila* DZ0503SBS1, cepa encontrada en la localidad de San Pedro durante la época de lluvia, tiene una correlación mayor a la producción de Ácido indolacético y por último tenemos a las cepas 9 y 10 ambas identificadas como *Bacillus velezensis* strain FZB42, encontradas en el municipio de Banámichi durante la época de lluvia y Post-Lluvia respectivamente, suguiendo una diferencia en cuanto a la solubilización de fosfato de estas dos cepas en este municipio con respecto a las otras cepas también identificadas como *B. velezensis*.

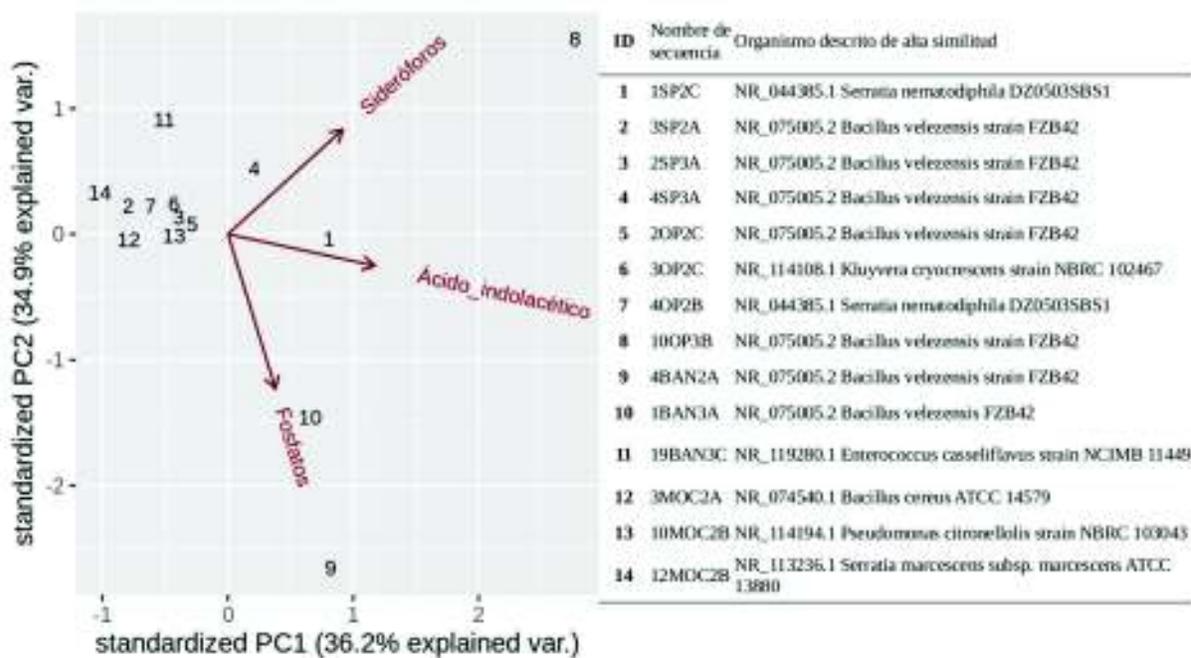


Figura 26. Análisis de componentes principales (PCA), de aislamientos bacterianos. Los vectores representan la producción de sideróforos, la solubilización de fosfato inorgánico y la producción de compuestos indólicos. Flechas en el gráfico que muestran la dirección del vector. Los números en el gráfico muestran la posición de los aislados bacterianos con las mismas características.

VI.14 Extracción de ADN Bacteriano

La extracción de ADN bacteriano se realizó satisfactoriamente en 14 Cepas aisladas siguiendo la metodología descrita en materiales y métodos. La integridad del ADN se observó en un gel de agarosa al 1% utilizando 1 μ l De GelRed® (Biotium), donde las muestras mostraban una buena calidad (Figura 27).

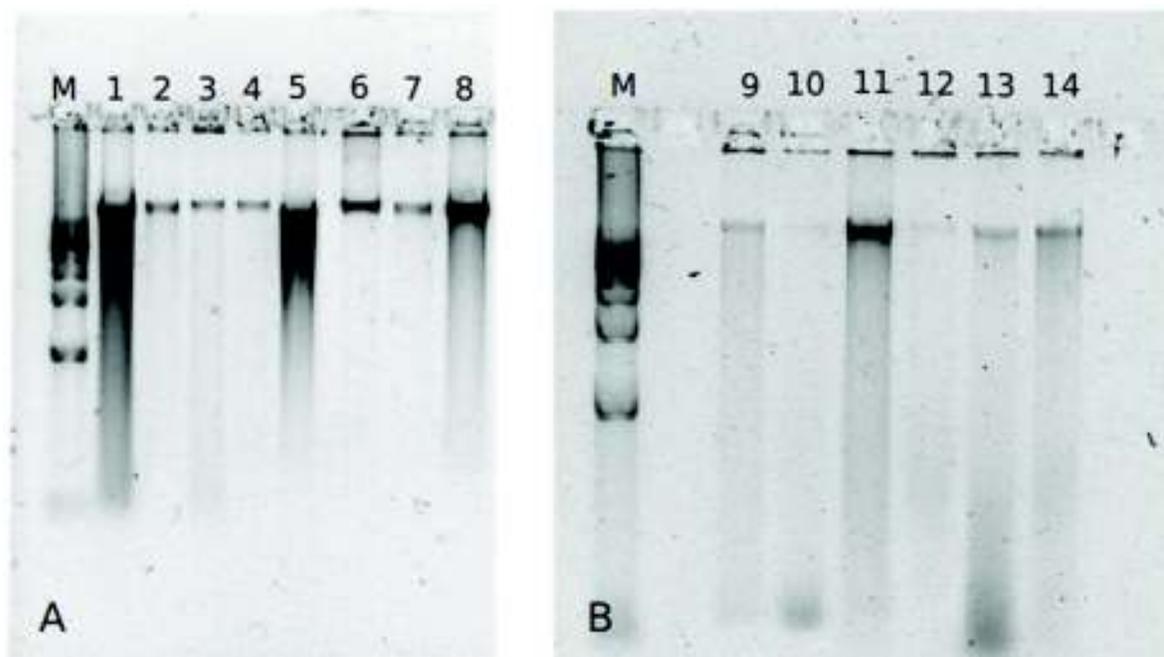


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con muestras de ADN que fueron extraídas usando el protocolo modificado de Bergallo *et al.* (2006). (A) Carril M: Marcador de peso molecular 1Kb. Carril 1 al 8: 1SP2C, 3SP2A, 1BAN3A, 4SP3A, 2OP2C, 3OP2C, 4OP2B y 10OP3B. (B) Carril M: Marcador de peso molecular 1Kb. Carril 9 al 14: 3MOC2A, 2SP3A, 19BAN3C, 4BAN2A, 10MOC2B y 12MOC2B.

VI.14.1 Cuantificación de ADN Bacteriano

Para la cuantificación se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EU), donde se midió la pureza y las concentraciones de ADN de las cepas seleccionadas. La relación 260/280 varió entre 1.37 y 1.46. La cuantificación de ADN de las 14 bacterias seleccionadas como posibles promotoras del crecimiento vegetal, revelaron

muestras con concentraciones aceptables de ADN, las cuales variaron de 27.1 ng/μl hasta 167 ng/μl en la concentración más alta.

VI.14.2 Amplificación del gen 16S rDNA, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La electroforesis del producto de PCR arrojó como resultado una única banda de aproximadamente 1.5 kb lo cual correspondió con el tamaño del fragmento esperado en la (Figura 28). En las cepas de interés, la amplificación del gen 16S rRNA se obtuvo utilizando el protocolo de PCR siguiente: desnaturalización a 95 ° C durante 5 min, 25 ciclos de 30 s a 95 ° C, 30 s con una alineación a 57°C durante 40 s, con una elongación a 72 ° C durante 2 min, y finalizar en una elongación final a 72 ° C, 5 min.

Para el caso de las cepas aisladas 1SP1A y 4OP2B se utilizó el método de Touchdown PCR para su amplificación como se mencionó en materiales y métodos.

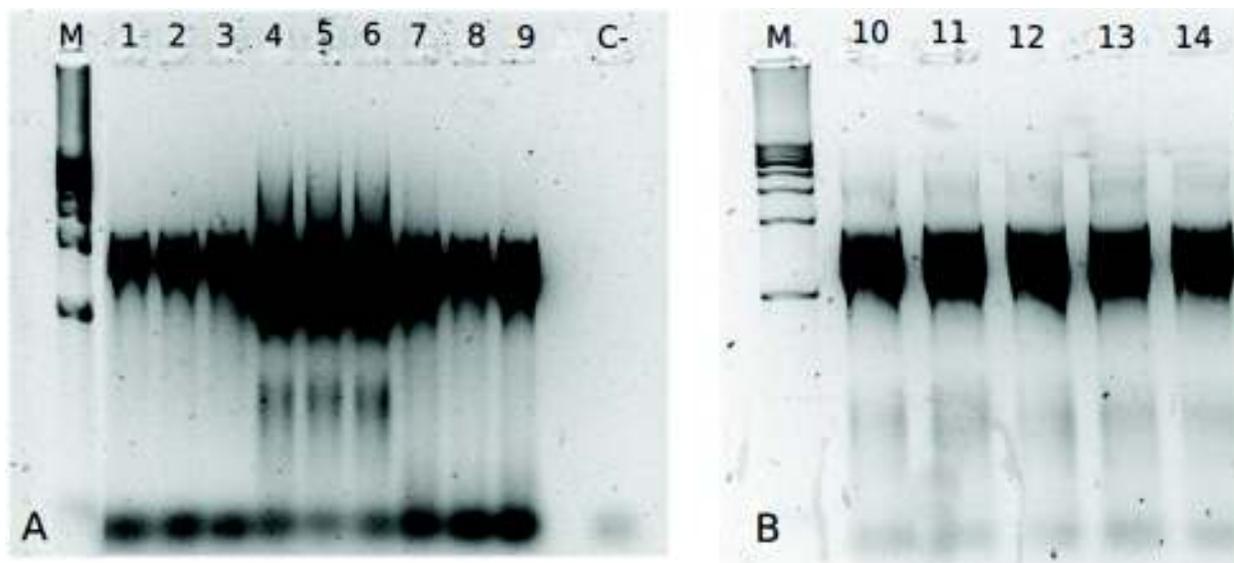


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con productos de PCR obtenidos de la amplificación del gen 16S rRNA. (A) Carril M: Marcador de peso molecular 1Kb. Carril 1 al 9: 1SP2C, 3SP2A, 2SP3A, 4SP3A, 2OP2C, 3OP2C, 4OP2B, 10OP3B y 4BAN2A. Carril C-: Control negativo. (B) Carril M: Marcador de peso molecular 1Kb. Carril 10 al 14: 1BAN3A, 19BAN3C, 3MOC2A, 10MOC2B y 12MOC2B.

VI.14.3 Purificación de los productos de PCR del gen 16S rDNA a partir de las cepas seleccionadas utilizando el Kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN TM)

Se purificaron los productos de PCR de 14 cepas bacterianas aisladas de interés seleccionadas para su identificación a un volumen final de 20 μ l, con una concentración de 250 ng por reacción (concentración de 10 ng/ μ l).

La integridad de la muestra se verificó obteniendo una relación O.D. 260/280nm en un rango de 1.7-2.0 y la relación Abs 260/230 en 2.0 (Figura 29).

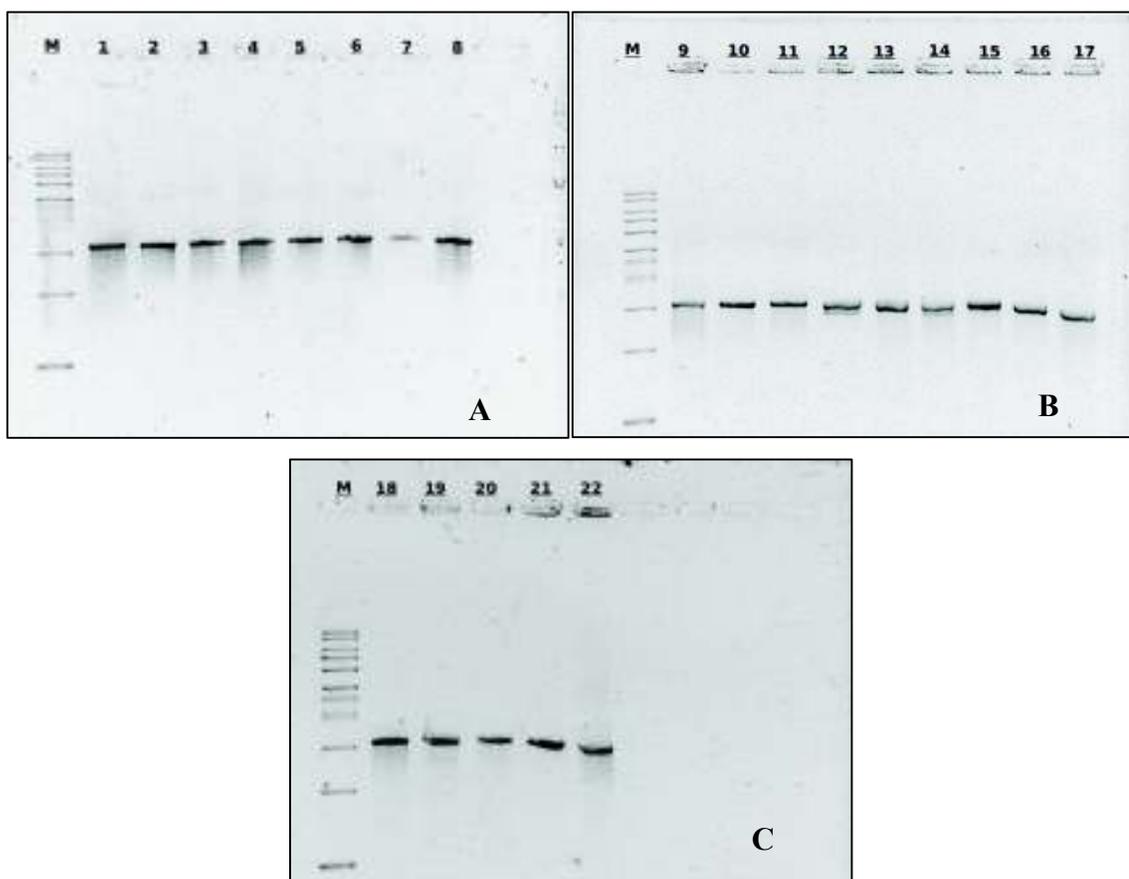


Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con productos de PCR de bacterias seleccionadas para su identificación. A) Carril M: Marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 1 al 8: 1SP1A, 1SP2C, 3SP2A, 4SP2A, 2SP3A, 3SP3A, 4SP3A, 1OP2B. B) Carril M: Marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 9 al 17: 2OP2C, 3OP2C, 4OP2B, 28OP2A, 32OP2D, 10OP3B, 19OP3B, 4BAN2A, 7BAN2B. B) Carril M: Marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 18 al 22: 1BAN3A, 19BAN3C, 3MOC2A, 10MOC2B, 12MOC2B.

Todos los aislados de BPCV tienen un por arriba del 99% de similitud con la secuencia del gen informada. Donde el 50% de los aislados de BPCV son identificados como el género de *Bacillus* (3SP2A, 2SP3A, 4SP3A, 2OP2C, 10OP3B, 4BAN2A y 1BAN3A) seguido del género *Enterococcus* con 14.5% del total (19BAN3C y 3MOC2A), *Kluyvera* 7.14% (3OP2C), *Serratia* 21.42% (1SP2C, 4OP2B y 12MOC2B) y *Pseudomonas* 7.14% (10MOC2B) (Figura 31).

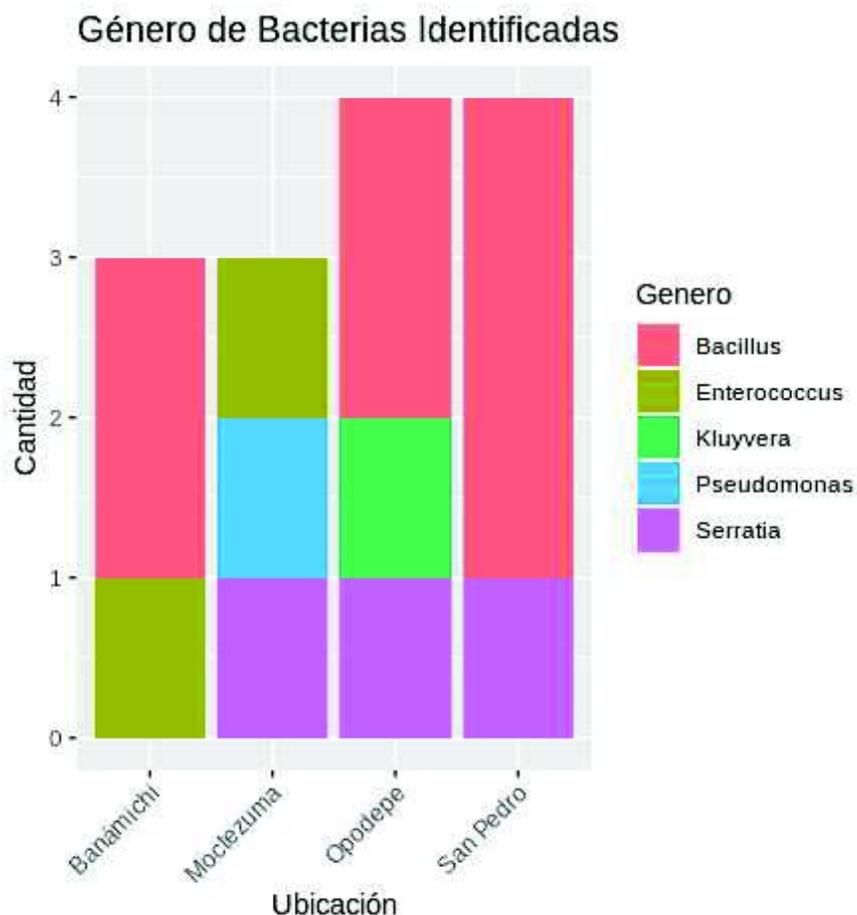


Figura 31. Género de bacterias identificadas de acuerdo al municipio.

Podemos observar en la Figura 31 los géneros bacterianos por cada municipio; en Banámichi observamos al género *Bacillus* y *Enterococcus*, en el municipio de Moctezuma, podemos observar un género exclusivo para esta región el cual es el de *Pseudomonas*, pero también se encontraron los géneros *Serratia* y *Enterococcus*, siendo éste el municipio con más

variabilidad de géneros bacterianos, cabe destacar que en esta región se encontraron los frutos de chiltepín de mayor tamaño, también es el lugar asociado a mayor humedad durante la época de lluvia. En cuanto al municipio de Opodepe podemos observar otro género exclusivo de esta localidad; *Kluyvera*, e incidiendo con los demás municipios encontramos *Serratia* y *Bacillus*, en cuanto a la localidad de San Pedro el Saucito en el municipio de Hermosillo, cuenta con los géneros de *Serratia* y *Bacillus*, siendo esta última la más abundante en todos los aislados.

Tabla 13. Determinación filogenética de 14 bacterias encontradas prevalentes en la rizosfera asociada a *Capsicum annuum L. var. glabriusculum*, basadas en la secuencia parcial del gen 16S rRNA.

Nombre de secuencia	Afiliación filogenética (Filo/Clase/Orden)	Overlap (nt)	Organismo descrito de similitud alta y secuencia de referencia NCBI	Identidad (%)	Score	E value
1SP2C	<i>Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Enterobacteriales</i>	632	NR_044385.1 <i>Serratia nematodiphila</i> DZ0503SBS1	100	1141 bits (1264)	0.0
3SP2A	<i>Firmicutes/ Bacilli/ Bacillales</i>	629	NR_075005.2 <i>Bacillus velezensis</i> strain FZB42	100	1135 bits (1258)	0.0
2SP3A	<i>Firmicutes/ Bacilli/ Bacillales</i>	632	NR_075005.2 <i>Bacillus velezensis</i> strain FZB42	100	1141 bits (1264)	0.0
4SP3A	<i>Firmicutes/ Bacilli/ Bacillales</i>	632	NR_075005.2 <i>Bacillus velezensis</i> strain FZB42	100	1141 bits (1264)	0.0
2OP2C	<i>Firmicutes/ Bacilli/ Bacillales</i>	632	NR_075005.2 <i>Bacillus velezensis</i> strain FZB42	100	1141 bits (1264)	0.0
3OP2C	<i>Proteobacteria/ Gammaproteobacteria/ Enterobacteriales</i>	632	NR_114108.1 <i>Kluyvera cryocrescens</i> strain NBRC 102467	100	1133 bits (1256)	0.0
4OP2B	<i>Proteobacteria/ Gammaproteobacteria/ Enterobacteriales</i>	632	NR_044385.1 <i>Serratia nematodiphila</i> DZ0503SBS1	100	1141 bits (1264)	0.0
10OP3B	<i>Firmicutes/ Bacilli/ Bacillales</i>	632	NR_075005.2 <i>Bacillus velezensis</i> strain FZB42	100	1141 bits (1264)	0.0
4BAN2A	<i>Firmicutes/ Bacilli/ Bacillales</i>	632	NR_075005.2 <i>Bacillus velezensis</i> strain FZB42	100	1141 bits (1264)	0.0
1BAN3A	<i>Firmicutes/ Bacilli/ Bacillales</i>	626	NR_075005.2 <i>Bacillus velezensis</i> FZB42	100	1130 bits (1252)	0.0

19BAN3C	<i>Firmicutes/ Bacilli/ Lactobacillales</i>	650	NR_119280.1 <i>Enterococcus casseliflavus strain NCIMB 11449</i>	100	1173 bits (1300)	0.0
3MOC2A	<i>Firmicutes/ Bacilli/ Bacillales</i>	633	NR_074540.1 <i>Bacillus cereus ATCC 14579</i>	100	1142 bits (1266)	0.0
10MOC2B	<i>Proteobacteria/ Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales</i>	321	NR_114194.1 <i>Pseudomonas citronellolis strain NBRC 103043</i>	99	569 bits (630)	4e-162
12MOC2B	<i>Proteobacteria/ Gammaproteobacteria/ Enterobacterales</i>	630	NR_113236.1 <i>Serratia marcescens subsp. marcescens ATCC 13880</i>	100	1139 bits (1262)	0.0

En el Municipio de Banámichi durante la época de lluvias, se identificó la cepa 4BAN2A, como *Bacillus velezensis* y durante la época post-lluvia las cepas: 1BAN3A y 19BAN3C como *Bacillus velezensis* y *Enterococcus casseliflavus* (Tabla 15).

En el Municipio de Moctezuma durante la época de lluvias, se identificó tres BPCV 3MOC2A, 10MOC2B y 12MOC2B como *Bacillus cereus*, *Pseudomonas citronellolis* y *Serratia marcescens* (Tabla 15).

En el Municipio de Hermosillo, en la localidad de San Pedro El Saucito, asociado al chiltepín cultivado en casa sombra, se identificaron las cepas 1SP2C y 3SP2A durante la época de lluvias, como *Serratia nematodiphila* y *Bacillus velezensis* respectivamente. También se identificó las dos cepas asociadas a la época post-lluvia (2SP3A y 4SP3A) como *Bacillus velezensis*.

En el Municipio de Opodepe, durante la época de lluvias se identificaron tres BPCV; 2OP2C, 3OP2C y 4OP2B como: *Bacillus velezensis*, *Kluyvera cryocrescens* y *Serratia nematodiphila*. Durante la época post-lluvia se identificó la cepa 10OP3B como *Bacillus velezensis* (Tabla 15).

VI.15.3 Árbol Filogenético

Con estos resultados (Tabla 15) se realizó un análisis filogenético, utilizando las secuencias del gen 16S rDNA para cada género; como especie fuera del grupo se eligió a NR_135866.1

Adicionalmente, muchos de los géneros reportados en el presente trabajo han sido reportados como destacados BPCV por ejemplo los sideróforos producidos por el género *Pseudomonas* pueden reducir la tasa de crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum* y de la bacteria *Rhizoctonia solani* en la rizosfera (Beneduzi *et al.*, 2012).

Las especies de *Bacillus* se consideran BPCV importantes, que producen una amplia gama de metabolitos secundarios biológicamente activos que pueden inhibir potencialmente el crecimiento de patógenos de plantas y microorganismos rizosféricos perjudiciales (Ongena *et al.*, 2008; Rabbee *et al.*, 2019). *Bacillus* spp. se prefieren en los sistemas agrícolas, debido a su capacidad para formar endosporas, que pueden sobrevivir a la exposición al calor y a la desecación, y su capacidad para formularse en polvos secos estables con una larga vida útil (Chowdhury *et al.*, 2013).

Bacillus spp. es habitante común de la rizosfera, los agentes biocontrol a base de esporas de *Bacillus* tienen poco o ningún efecto en la composición de las comunidades microbianas de la raíz de la planta (Wu *et al.*, 2015). Varios productos basados en *Bacillus* ahora están disponibles comercialmente como: RhizoVital® (*Bacillus amyloliquefaciens* FZB42; ABiTEP, GmbH, Berlín, Alemania), Amylo X® WG (*B. amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* D747; Certis Europe BV, Países Bajos), RhizoPlus® (*B. subtilis* FZB24; ABiTEP), Sonata® (*B. pumilus* QST2808; AgraQuest, Inc., Davis, California, EE. UU.), Taegro® (*B. subtilis* var. *Amyloliquefaciens* FZB24; Novozymes Biologicals, Inc., Salem, Virginia, EE. UU. (Pérez *et al.*, 2011).

B. amyloliquefaciens FZB42, ahora reclasificado como una *B. velezensis*. La cepa es capaz de estimular el crecimiento de las plantas y producir diferentes tipos de metabolitos secundarios biológicamente activos que suprimen la microflora patógena de las plantas (Krebs *et al.*, 1998). Mientras tanto, *B. velezensis* se ha formulado en el fungicida Botrybel (Agricaldes, España) comercialmente disponible, debido a su actividad contra *Botrytis cinerea*, un agente etiológico del moho gris, que según los estudios infecta a más de 200 especies de plantas en todo el mundo (Romanazzi *et al.*, 2014; (Rabbee *et al.*, 2019). *B. velezensis* (cepa CR-502T y cepa CR-14b) se aisló por primera vez tomadas de la desembocadura del río Vélez en Torre del mar en la provincia de Málaga, España (Ruiz *et al.*, 2005).

Serratia marcescens es una bacteria gramnegativa (familia *Enterobacteriaceae*). Ha sido ampliamente conocido como un patógeno (Flyg *et al.*, 1983; Bahar *et al.*, 2007) y como un organismo que descompone los alimentos (Abdour 2003). También se ha informado que promueve el crecimiento vegetal al inducir resistencia contra los patógenos de las mismas (Kloepper *et al.*, 1993), la producción de sustancias antagonistas (de Queiroz *et al.*, 2006) y la solubilización de fosfatos (Tripura *et al.*, 2007).

VII. CONCLUSIONES

Se observó que el pH de suelo asociado al chiltepín cultivado en San Pedro el Saucito presentó un pH alcalino (aprox. 9) en todas las épocas del año muestreadas. A diferencia del pH de suelo asociado al chiltepín silvestre que presentó un pH menor (6.24 a 7), en los municipios de Moctezuma y Banámichi en las 3 épocas del año muestreadas.

En el caso del municipio de Opodepe, éste presentó un pH alcalino; sin embargo, disminuyó el pH en la época de lluvias y restableciendo su pH nuevamente en la época post-lluvia.

No se encontraron diferencias significativas en las diferentes épocas del año en el contenido de amonio en el suelo; sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas en el contenido de amonio entre los municipios de Banámichi, Opodepe y San Pedro el Saucito, con respecto al municipio de Moctezuma.

Se encontró un mayor contenido de nitritos en el suelo analizado en el municipio de Opodepe en la época de lluvia con una diferencia significativa comparado con los otros municipios y épocas del año.

En la muestra de suelo analizada en el municipio de Opodepe se encontró un mayor contenido de nitrato en la época seca; mientras que en San Pedro el Saucito se encontró la menor cantidad de nitrato en el suelo analizado correspondiente a la época post-lluvia.

Las diferencias significativas encontradas entre las especies nitrogenadas (amonio, nitrato y nitrato), en función de la temporalidad y localización en la cuantificación de la reserva de nitrógeno inorgánico sugieren que existen efectos diferenciales en la determinación de nitrógeno inorgánico en suelos asociados al chiltepín en las diferentes localizaciones y época de año.

Se identificaron 14 cepas bacterianas aisladas asociadas al Chiltepín (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) con base en sus características microscópicas, macroscópicas y su identidad molecular mediante secuenciación del fragmento 16S rDNA, se observó que las bacterias evaluadas tuvieron algunas de las características asociadas a promoción de crecimiento vegetal *in vitro* (solubilización de fósforo, producción de índoles, producción de sideróforos).

Se identificaron siete bacterias promotoras del crecimiento vegetal, ideales como inoculador para ayudar en los procesos de bioremediación (*Bacillus velezensis* FZB42, *Serratia nematodiphila* DZ0503SBS1, *Kluyvera cryocrescens* strain NBRC 102467, *Enterococcus casseliflavus* strain NCIMB 11449, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Pseudomonas citronellolis* strain NBRC 103043, *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* ATCC 13880).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) cultivables asociadas con el chiltepín (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) no representan conjuntos aleatorios, sino que muestran estructuras filogenéticas definidas que forman grupos en común (core) sin importar la variación de lugar y época del año, mientras que existe otro grupo que son particulares para cada lugar y época, asociados al chiltepín silvestre y cultivado.

VIII. RECOMENDACIONES

- El análisis filogenético de la secuencia del gen 16S rRNA tiene un poder insuficiente para discriminar entre las especies de *Bacillus* debido a la naturaleza altamente conservada de este gen (Rooney *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2019). Por lo que se recomienda hacer la evaluación de *B. velezensis* comparando secuencias completas del gen rpoB que codifica a la subunidad β del ARN polimerasa (Fan *et al.*, 2017).
- Para determinar la funcionalidad de fijación de nitrógeno se recomienda realizar un estudio para analizar el gen nifH de las comunidades bacterianas asociadas a la rizosfera de *Capsicum annuum L. var. glabriusculum*.
- El suelo es un sistema complejo que alberga una gran cantidad y diversidad de microorganismos. Las bacterias son microorganismos muy abundantes en estas comunidades, pero los hongos, oomicetos, algas, protozoos, nematodos y virus también son contribuyentes importantes (Müller *et al.*, 2016); por lo que se recomienda realizar un análisis metagenómico sobre estas comunidades con la finalidad de comparar cómo cambian las comunidades microbianas a través de las diferentes épocas del año, utilizando un enfoque de metagenómica comparativa.
- Se recomienda ampliamente elaborar estrategias de inoculación de las BPCV identificadas en este estudio, principalmente con *Bacillus velezensis* en chiltepín (*Capsicum annuum L. var. glabriusculum*) para evaluar su capacidad promotora del crecimiento vegetal.

IX. LITERATURA CITADA

- Abdour, A.M. 2003. Purification and partial characterization of psychrotrophic *Serratia marcescens* lipase. *J Dairy Sci*86, 127–132.
- Alexander, D, Zuberer, D. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*. 12. 39-45. 10.1007/BF00369386.
- Ali, B., Sabri, A., Ljung K., Hasnain, S. 2009. Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phytostimulatory effect on *Vignaradiata*. *World J Microbiol Biotechnol* 25:519-526.
- Alden L, Demoling F, Baath E. 2001. Método rápido para determinar los factores que limitan el crecimiento bacteriano en el suelo. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 1830–38.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J.H., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 25, 3389–3402.
- Alvarez-Parrilla, E., de la Rosa, L., Amarowicz, R., Shahidi, F. 2011. Antioxidant Activity of Fresh and Processed Jalapeño and Serrano Peppers. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 163-173. doi: 10.1021/jf103434u
- Anjum MA, Sajjad MR, Akhtar N, Qureshi MA, Iqbal A, Jami AR, Hasan M. 2007. Response of cotton to plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation under different levels of nitrogen. *J. Agric. Res*. 45:135-143.
- Arango, Y., and K.-P. Heise. 1998. Localization of tocopherol synthesis in chromoplast envelope membranes of *Capsicum annuum* L. fruits. *J. Exp. Bot.* doi:10.1093/ jxb/49.324.1259.
- Armada E, Roldán A, Azcón R. 2014. Differential activity of autochthonous bacteria in controlling drought stress in native *Lavandula* and *Salvia* plants species under drought conditions in natural arid soil. *Microbial Ecology* 67: 410–420. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0326-9>
- Armada E, Portela G, Roldán A, Azcón R. 2014. Combined use of beneficial soil microorganism and agrowaste residue to cope with plant water limitation under semiarid conditions. *Geoderma* 232–234: 640–648. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2014.06.025>
- Austin, A. T., L. Yahdjian, J. M. Stark, J. Belnap, A. Porporato, U. Norton, D. A. Ravetta, and S. M. Schaeffer. 2004. Water pulses and biogeochemical cycles in arid and semiarid ecosystems. *Oecologia* 141: 221-235.
- Aza-González, C., H.G. Núñez-Palenius, N. Ochoa-Alejo. 2011. Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum spp.*). *Plant Cell Rep*. 30:695–706. doi:10.1007/s00299-010-0968-8
- Bahar, A.A. and Demirbag, Z. 2007. Isolation of pathogenic bacteria from *Oberea linearis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Biologia*62, 13–18.
- Baker KL, Langenheder S, Nicol GW, Ricketts D, Killham K, Campbell CD *et al.* (2006) Deeb, B., Fayez, K., & Gherbawy, Y. (2013). Isolation and characterization of endophytic bacteria from *Plectranthus tenuiflorus* medicinal plant in Saudi Arabia desert and their antimicrobial activities. *Journal Of Plant Interactions*, 8(1), 56-64. doi: 10.1080/17429145.2012.6800779). Environmental and spatial characterisation of bacterial community composition in soil to inform sampling strategies. *Soil Biol Biochem* 41: 2292–2298.

- Bañuelos, Noemí, Salido, Patricia L., Gardea, Alfonso. 2008. Etnobotánica del chiltepín: Pequeño gran señor en la cultura de los sonorenses. *Estudios sociales (Hermosillo, Son.)*, 177-205.
- Barboza, G. 2011. Lectotypifications, synonymy, and a new name in *Capsicum* (Solanoideae, Solanaceae). *Phytokeys*. doi: 10.3897/phytokeys.2.730
- Barbaro, L., (2015) Karlanian, M., & Mata, D. Importancia del pH y la Conductividad Eléctrica (CE) en los sustratos para plantas. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Bartel, B., & Woodward, A. 2005. Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals Of Botany*, 707-735. doi: 10.1093/aob/mci083
- Benabdellah K, Abbas Y, Abourouh M, Aroca R, Azcón R. 2011. Influence of two bacterial strains isolated from semi-arid zone and their interaction with native arbuscular mycorrhizae on the growth of *Trifolium repens* under drought conditions: Mechanisms related to bacterial effectiveness. *European Journal Soil Biology*: 303–309. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2011.07.004>
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., Passaglia, L.M.P. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet. Mol. Biol.* 1044–1051. Ongena, M.; Jacques, P. *Bacillus lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol*. *Trends Microbiol.* 2008, 16, 115–125.
- Berrelleza-Valdez, F., Parades-Aguilar, J., Peña-Limón, C., Certucha-Barragán, M., Gámez-Meza, N., Serrano-Palacios, D. 2019. A novel process of the isolation of nitrifying bacteria and their development in two different natural lab-scale packed-bed bioreactors for trichloroethylene bioremediation. *Journal Of Environmental Management*, 211-218. doi: 10.1016/j.jenvman.2019.04.037
- Berg G. 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84:11–18
- Blom D, Fabbri C, Connor EC, Schiestl FP, Klauser DR, et al. 2011. Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environ. Microbiol.* 13:3047–58
- Boller T, He SY. 2009. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* 324:742–44
- Binkley, D. and S. C. Hart. 1989. The components of nitrogen availability assessments in forest soils. *Adv. Soil Sci.* 10: 57-112.
- Binkley, D. y P. Vitousek. 1989. Soil nutrient availability. p. 75-96. En: Pearcy R.W., J. Ehleringer, H.A. Mooney y Rundel. *Plant physiological ecology field methods and instrumentation*. Londres. Chapman y Hall.
- Bosland, P.W., Votava, E.J., 1999. *Peppers: Vegetable and Spice Capsicums*. CAB, UK.
- Bulgarelli, D., Schlaeppli, K., Spaepen, S., van Themaat, E., & Schulze-Lefert, P. 2013. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annual Review Of Plant Biology*, 807-838. doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120106
- Caporaso, J., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F., Costello, E. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5), 335-336. doi:10.1038/nmeth.f.303

- Cassio-Madrado E., Robles-Parra J. y Miranda-Zarazúa, H. 2006. La recolección de chiltepín como una opción económica para los habitantes del Río Sonora en V Simposio Internacional sobre la Flora Silvestre en Zonas Áridas. Hermosillo, Sonora
- Cameron K. C., Di H. J. y Moir J. L. 2013. Nitrogen losses from the soil/plant system: a review. *Ann. Appl. Biol.*, 145-173. DOI: 10.1111/aab.12014
- Cassman, K., Dobermann, A., & Walters, D. 2002. Agroecosystems, Nitrogen-use Efficiency, and Nitrogen Management. *AMBIO: A Journal Of The Human Environment*, 132. doi: 10.1639/0044-7447.
- Celaya-Michel M, Hernán, García O, Felipe, Rodríguez, Julio C., Castellanos Villegas, Alejandro E. 2015. Cambios en el almacenamiento de nitrógeno y agua en el suelo de un matorral desértico transformado a sabana de buffel (*Pennisetum ciliare* (L.) Link). *Terra Latinoamericana*, 79-93.
- Celaya-Michel, Hernán, & Castellanos-Villegas, Alejandro E. 2011. Mineralización de nitrógeno en el suelo de zonas áridas y semiáridas. *Terra Latinoamericana*, 29(3), 343-356.
- Calderón, K., Philippot, L., Bizouard, F., Breuil, M., Bru, D., & Spor, A. 2018. Compounded Disturbance Chronology Modulates the Resilience of Soil Microbial Communities and N-Cycle Related Functions. *Frontiers In Microbiology*, 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.02721
- Chaudhary, N., Sharma, A., Agarwal, P., Gupta, A., Sharma, V. 2015. 16S Classifier: A Tool for Fast and Accurate Taxonomic Classification of 16S rRNA Hypervariable Regions in Metagenomic Datasets. *PLOS ONE*, e0116106. doi: 10.1371/journal.pone.0116106
- Chowdhury, S.P.; Dietel, K.; Rändler, M.; Schmid, M.; Junge, H.; Borriss, R.; Hartmann, A.; Grosch, R. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on Lettuce growth and health under pathogen pressure and its impact on the rhizosphere bacterial community. *PLoS ONE* 2013, 8, 1–10.
- Combes-Meynet E, Pothier JF, Moenne-Loccoz Y, Prigent Combaret C. 2011. The Pseudomonas secondary metabolite 2,4 diacetylphloroglucinol is a signal inducing rhizoplane expression of Azospirillum genes involved in plant growth promotion. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24:271–84
- Corrales Ramírez MSc, L., Caycedo Lozano MSc, L., Gómez Méndez, M., Ramos Rojas, S., & Rodríguez Torres, J. 2017. *Bacillus* spp: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. *Nova*, 15(27), 45. doi: 10.22490/24629448.1958
- Cubero, O.F., Crespo, A., Fatehi, J., Bridge P.D. *Plant Systematics and Evolution*, .1999. 216:243. <https://doi.org/10.1007/BF01084401>
- Dastager SG, Deepa CK, Pandey A .2010. Potential plant growth promoting activity of *Serratia nematophila* NII-0.928 on black papper (*Piper nigrum* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27:259-265.
- DellaPenna, D., and B.J. Pogson. 2006. Vitamin synthesis in plants: Tocopherols and carotenoids. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:711– 738. doi:10.1146/annurev.arplant.56.032604.144301
- Delvasto, P., Valverde, A., Ballester, A., Moñoz, J., González, F., Blázquez, M., Igual, J., Garcia-Balboa, C. 2008. Diversity and activity of phosphate bioleaching bacteria from a high-phosphorus iron ore. *Hydrometallurgy.* 92:124-129.
- De los Santos-Villalobos Sergio, De Folter Stefan, Délano-Frier John P., Gómez L. Miguel A., Guzmán-Ortiz Doralinda, Peña C. Juan. 2013. Growth Promotion and Flowering Induction in Mango (*Mangifera indica* L. cv "Ataulfo") Trees by Burkholderia and Rhizobium Inoculation: Morphometric, Biochemical, and Molecular Events. *Journal of Plant Growth Regulation.* 10.1007/s00344-013-9329-5.

- De Vleeschauwer D, Hofte M. 2009. Rhizobacteria-induced systemic resistance. *Plant Innate Immun.* 51:223–81
- De-Bashan LE, Hernandez J-P, Bashan Y. 2012. The potential contribution of plant growth- promoting bacteria to reduce environmental degradation - A comprehensive evaluation. *Applied Soil Ecology* 61: 171–189. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.09.003>
- De Queiroz, B.P.V, de Melo, I.S. 2006. Antagonism of *Serratia marcescens* towards *Phytophthora parasitica* and its effects in promoting the growth of citrus. *Brazilian JMicrobiol* 37, 448–450.
- Di, D., Zhang, C., Luo, P., An, C., & Guo, G. 2015. The biosynthesis of auxin: how many paths truly lead to IAA?. *Plant Growth Regulation*, 78(3), 275-285. doi: 10.1007/s10725-015-0103-5
- Dréo Johann, imagen, ciclo del nitrógeno, Creado el: 22 de abril de 2015; https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ciclo_del_nitr%C3%B3geno.svg#/media/Archivo:Ciclo_del_nitr%C3%B3geno.svg
- Dubuis C, Keel C, Haas D. 2007. Dialogues of root-colonizing biocontrol pseudomonads. *Eur. J. Plant Pathol.* 119:311–28
- Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellín, C., Lurie, E., Podishetty, N., & Bhatnagar, S. et al. 2015. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 112(8), E911-E920. doi: 10.1073/pnas.1414592112
- El-Deeb, B., Fayez, K., Gherbawy, Y. 2013. Isolation and characterization of endophytic bacteria from *Plectranthus tenuiflorus* medicinal plant in Saudi Arabia desert and their antimicrobial activities. *Journal Of Plant Interactions*, 8(1), 56-64. doi: 10.1080/17429145.2012.680077
- Enders, T., & Strader, L. 2015. Auxin activity: Past, present, and future. *American Journal Of Botany*, 102(2), 180-196. doi: 10.3732/ajb.1400285
- Emmert EAB, Handelsman J. 1999. Biocontrol of plant disease: a (gram-) positive perspective. *FEMS Microbiol. Lett.* 171:1–9
- Eshbaugh, W. 1975. Genetic and Biochemical Systematic Studies of Chili Peppers (Capsicum-Solanaceae). *Bulletin Of The Torrey Botanical Club*, 102(6), 396. doi: 10.2307/2484766
- Fahad, S., Hussain, S., Matloob, A., Khan, F., Khaliq, A., & Saud, S. et al. 2014. Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. *Plant Growth Regulation*, 75(2), 391-404. doi: 10.1007/s10725-014-0013-y
- Falkowski, P. G., Fenchel, T., & Delong, E. F. 2008. The Microbial Engines That Drive Earth’s Biogeochemical Cycles. *Science*, 320(5879), 1034–1039. doi:10.1126/science.1153213
- Fan, B.; Blom, J.; Klenk, H.P.; Borriss, R. 2017. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an “operational group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex. *Front. Microbiol.* 8, 1–15.
- FAO. 2002. Los fertilizantes y su uso. Roma.
- Ferreira, J., Andersen, J., Borja, A., Bricker, S., Camp, J., & Cardoso da Silva, M. *et al.* 2011. Overview of eutrophication indicators to assess environmental status within the European Marine Strategy Framework Directive. *Estuarine, Coastal And Shelf Science*, 93(2), 117-131.
- Fierer, N., Lauber, C., Ramirez, K., Zaneveld, J., Bradford, M., & Knight, R. 2011. Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *The ISME Journal*, 6(5), 1007-1017.

- Fierer, N., J. P. Schimel, and P. A. Holden. 2003. Influence of drying-wetting frequency on soil bacterial community structure. *Microb. Ecol.* 45: 63-71.
- Fierer N, Jackson RB. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 626–631.
- Fisher, F. M., L. W. Parker, J. P. Anderson, and W. G. Whitford. 1987. Nitrogen mineralization in a desert soil: Interacting effects of soil moisture and nitrogen fertilizer. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 51: 1033-1041.7
- Flyg, C. and Xanthopoulos, K.G. 1983. Insect pathogenic properties of *Serratia marcescens*, passive and active resistance to insect immunity studied with protease deficient and phage-resistant mutants. *J Gen Microbiol* 129, 453–464.
- Forero, M., Quijano, C., & Pino, J. 2009. Volatile compounds of chile pepper (*Capsicum annum* L. var. *glabriusculum*) at two ripening stages. *Flavour And Fragrance Journal*, 24(1), 25-30. doi: 10.1002/ffj.1913
- Fukushima, T.; Allred, B.E.; Sia, A.K.; Nichiporuk, R.; Andersen, U.N.; Raymond, K.N. Gram-positive siderophore-shuttle with iron-exchange from Fe-siderophore to apo-siderophore by *Bacillus cereus* YxeB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013, 110, 13821–13826
- Frey SD, Knorr M, Parrent JL, Simpson RT. 2004. Chronic nitrogen enrichment affects the structure and function of the soil microbial community in temperate hardwood and pine forests. *For Ecol Manag* 196: 159–171
- Gilg, O., Kovacs, K., Aars, J., Fort, J., Gauthier, G., & Grémillet, D. *et al.* 2012. Climate change and the ecology and evolution of Arctic vertebrates. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 1249(1), 166-190.
- Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 2, 109-117. <http://dx.doi.org/10.1139/m95-015>
- Glick, B. 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, 1-15. doi: 10.6064/2012/963401
- Gómez, L., & García, C. 2017. Variaciones adaptativas en la talla de la megafauna bentónica de fondos blandos tropicales en función de parámetros bióticos y abióticos. *Revista De Biología Tropical*, 65(2).
- González Jara, P., Moreno Letelier, A., Fraile, A., Piñero, D., & García Arenal, F. 2011. Impact of Human Management on the Genetic Variation of Wild Pepper, *Capsicum annum* var. *glabriusculum*. *Plos ONE*, 6(12), e28715.
- González-Mancilla, A., Almaraz-Suárez, J., Ferrera-Cerrato, R., Rodríguez-Guzmán, M., Taboada-Gaytán, O., & Trinidad-Santos, A. *et al.* 2017. Caracterización y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de chile poblano (*Capsicum annum* L.). *Revista Internacional De Contaminación Ambiental*, 33(3), 463-474. doi: 10.20937/rica.2017.33.03.09
- Gunnarsson. N., Mortensen, U., Sosio, M., Nielsen, j. 2004. Identification of the enther Doudoroff Pathway in an Antibiotic Producing Actinomycetes Species. *Molecular Microbiology*.52(3):895-92.
- Hariprasad, P., Niranjana, S. 2009. Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. *Plant Soil* .316:13-24.

- Hayano-Kanashiro, C., Gámez-Meza, N., & Medina-Juárez, L. 2016. Wild Pepper *L. var.*: Taxonomy, Plant Morphology, Distribution, Genetic Diversity, Genome Sequencing, and Phytochemical Compounds. *Crop Science*, 56(1), 1. doi:10.2135/cropsci2014.11.0789
- Hartmann, A.; Rothballer, M.; Schmid, M. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil* 2008, 312, 7–14
- Herman, R.P., K.R. Provencio, R.J. Torrez y G.M. Seager. 1994. Seasonal and spatial population dynamics of the nitrogen-efficient guild in a desert bajada grassland. *Applied Environ. Microbiol.* 60: 1160-1165.
- Hernández-Verdugo S, Guevara-González RG, Rivera-Bustamante S, Oyama K. 2001. Screening wild plants of *Capsicum annuum* for resistance to Pepper Huasteco Virus: Presence of viral DNA and differentiation among populations. *Euphytica* 122: 31–36.
- Hill, T. A., Ashrafi, H., Reyes-Chin-Wo, S., Yao, J., Stoffel, K., Truco, M. J., ... Van Deynze, A. 2013. Characterization of *Capsicum annuum* genetic diversity and population structure based on parallel polymorphism discovery with a 30K unigene Pepper GeneChip. *PloS one*, 8(2). doi:10.1371/journal.pone.0056200
- Hofmann, N. 2011. YUC and TAA1/TAR Proteins Function in the Same Pathway for Auxin Biosynthesis. *The Plant Cell*, 23(11), 3869-3869. doi: 10.1105/tpc.111.231112
- Horner, J.D., J.R. Gosz y R.G. Cates. 1988. The role of carbon-based plant secondary metabolites in decomposition in terrestrial ecosystems. *The American Naturalist*, 132: 869-883.
- Howard, L., Talcott, S., Brenes, C., & Villalon, B. 2000. Changes in Phytochemical and Antioxidant Activity of Selected Pepper Cultivars (*Capsicum* Species) As Influenced by Maturity. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 48(5), 1713-1720. doi: 10.1021/jf990916t
- INEGI, clima en Sonora. Retrieved, 25 October 2019, from <http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/son/territorio/clima.aspx?tema=me&e=26>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2019. Recuperado 5 de Octubre 2019, from <http://www.inafed.gob.mx>
- International Organization for Standardization. 2015. Soil quality — Determination of pH (ISO 10390:2005). Retrieved from www.iso.org/standard/40879.html
- Jain, P., and Patriquin, D. 1985. Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs. *Can. J. Microbiol.* 31: 206-210.
- J. Handelsman, 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 68, no. 4, pp. 669–685.
- Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem. Sci.* 23, 403–405.
- Jenkins SN, Waite IS, Blackburn A, Husband R, Rushton SP, Manning DC et al. 2009. Actinobacterial community dynamics in long term managed grasslands. 95: 319–334.
- Ji, S., Kim, J., Lee, C., Seo, H., Chun, S., & Oh, J. 2019. Enhancement of vitality and activity of a plant growth-promoting bacteria (PGPB) by atmospheric pressure non-thermal plasma. *Scientific Reports*, 9(1). doi: 10.1038/s41598-018-38026-z
- JMP versión 11. SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989-2019
- Keeney, D. R., & Nelson, D. W. 1982. Nitrogen-Inorganic Forms. In A. L. Page (Ed.), *Methods of Soil Analysis, Agronomy Monograph 9, Part 2* (2nd ed., pp. 643-698). Madison, WI: ASA, SSSA.

- Khenaka, K., Canfora, L., Benedetti, A., Leulmi, N., & Boulahrouf, A. 2019. Effect of *Capsicum annum* cultivated in sub-alkaline soil on bacterial community and activities of cultivable plant growth promoting bacteria under field conditions. *Archives Of Agronomy And Soil Science*, 65(10), 1417-1430. doi: 10.1080/03650340.2019.1566711
- Khalid A, Arshad M, Zahir ZA. 2004. Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol.* 96:473-480.
- Kim Y-C, Glick BR, Bashan Y, Ryu, C-M. 2012. Enhancement of plant drought tolerance by microbes. In: *Plant responses to drought stress: from morphological to molecular features*, Arocha R (ed). Chapter 15, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany; 383–413.
- Kim, Seungill, Minkyu Park, Seon-In Yeom, Yong-Min Kim, Je Min Lee, Hyun-Ah Lee, and Eunyoung Seo et al. 2014. Genome Sequence Of The Hot Pepper Provides Insights Into The Evolution Of Pungency In *Capsicum* Species. *Nature Genetics* 46 (3): 270-278. doi:10.1038/ng.2877.
- Knapp, Sandra, Lynn Bohs, Michael Nee, and David M. Spooner. 2004. Solanaceae A Model For Linking Genomics With Biodiversity. *Comparative And Functional Genomics* 5 (3): 285-291. doi:10.1002/cfg.393.
- Kloepper, J.W., Tuzun, S., Liu, L. and Wei, G. 1993. Plantgrowth-promoting rhizobacteria as inducers of systemicdisease resistance. In *Pest Management: Biologically Based Technologies* ed Lumsden, R.D. and Waughn, J. pp. 156–165 Washington, DC: American Chemical Society Books.
- Konopka, A. 2009. What is microbial community ecology?. *The ISME Journal*, 3(11), 1223-1230. doi:10.1038/ismej.2009.88
- Kopeloff, N., & Beerman, P. 1922. A modified Gram stain. *Experimental Biology and Medicine*, 20(2), 71–72. doi:10.3181/00379727-20-33
- Korbie, D., & Mattick, J. 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, 3(9), 1452-1456. doi: 10.1038/nprot.2008.133
- Kraft, K., Brown, C., Nabhan, G., Luedeling, E., Luna Ruiz, J., & Coppens d'Eeckenbrugge, G. et al. 2014. Multiple lines of evidence for the origin of domesticated chili pepper, *Capsicum annum*, in Mexico. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 111(17), 6165-6170. doi: 10.1073/pnas.1308933111
- Krajewska, A.M., Powers, J.J., 1988. Sensory properties of naturally occurring capsaicinoids. *J. Food Sci.* 53, 902-905.
- Krebs, B.; Höding, B.; Kübart, S.; Workie, M.A.; Junge, H.; Schmiedeknecht, G.; Grosch, R.; Bochow, H.; Hevesi, M. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 1998, 105, 181–197.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., Nei, M., 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software. Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- Maleki M, Mostafee S, Mokhaternejad L, Farzaneh M. 2010. Characterization of *Pseudomonas fluorescens* strain CV6 isolated from cucumber rhizosphere in Varamin as a potential bioccontrol agent. *Aust. J. Crop Sci.* 4(9):676-683.
- Mano, Y., & Nemoto, K. 2012. The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal Of Experimental Botany*, 63(8), 2853-2872. doi: 10.1093/jxb/ers091

- Martínez, L., Cilia, I., Beltrán, J. A., Roncalés, P. 2006. Effect of *Capsicum annuum* (Red Sweet and Cayenne) and *Piper nigrum* (black and white) pepper powders on the shelf life of fresh pork sausages packaged in modified atmosphere. *Journal of Food Science* 71, 48-53.
- Martínez L. Laura, Martínez P. Ramón A., Hernández I. Montserrat, Arvizu M. Sofia M. & Pacheco A. Juan R. 2013. Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista fitotecnia mexicana*, 36(1), 63-69.
- Mashiguchi, K., Tanaka, K., Sakai, T., Sugawara, S., Kawaide, H., & Natsume, M. et al. 2011. The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 108(45), 18512-18517. doi: 10.1073/pnas.1108434108
- Medina A, Azcón R. 2012. Reclamation strategies of semiarid Mediterranean soil: improvement of the efficiency of arbuscular mycorrhizal fungi by inoculation of plant growth promoting microorganisms and organic amendments. In *The mycorrhizal symbiosis in Mediterranean environment: importance in ecosystem stability and in soil rehabilitation strategies*. Hafidi M, Duponnois R, Nova Science, New York; 87–106.
- Mengual CM, Roldán A, Caravaca F, Schoebitz M. 2014. Advantages of inoculation with immobilised rhizobacteria versus amendment with olive-mill waste in the afforestation of a semiarid area with *Pinus halepensis* Mill. *Ecological Engineering* 73: 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.007>
- Mengual C, Schoebitz M, Azcón R, Roldán A. 2014. Microbial inoculants and organic amendment improves plant establishment and soil rehabilitation under semiarid conditions. *Journal of Environmental Management* 134: 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.01.008>
- Montoya-Ballesteros, L. C., & Gardea-Béjar, A., & Ayala-Chávez, G. M., & Martínez-Núñez, Y. Y., & Robles-Ozuna, L. E. 2010. Capsaicinoides y color en chiltepín (*Capsicum annuum* var. *aviculare*). Efecto del proceso sobre salsas y encurtidos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 9(2), undefined-undefined. ISSN: 1665-2738.
- Morán-Bañuelos, H., Aguilar-Rincón, V.H., Corona-Torres, T., Castillo-González, F., Soto-Hernández, R.M., San Miguel-Chávez, R. 2008. Capsaicinoides en Chiles nativos de Puebla, México. *Agrociencia* 42, 807-816.
- Mueller, J. Howard; Johnson, Everett R. 1941. Acid Hydrolysates of Casein to Replace Peptone in the Preparation of Bacteriological Media". *Journal of Immunology*. 40 (1): 33–38. ISSN 1550-6606.
- Nabhan, G., M. Slater, and L. Yarger. 1990. New crops small farmers in marginal lands? Wild chiles as a case study. In: M.A. Altieri and S.B. Hecht, editors, *Agroecology and small farm development*. CRC Press, Boca Raton, FL. p. 19–34
- Nautiyal, C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS microbiology Letters*. 170(1): 265-270.
- Nilsson LO, Bååth E, Falkengren-Grerup U, Wallander H. 2007. Crecimiento de micelios ectomicorrícicos y composición de comunidades microbianas del suelo en suelos de roble a lo largo de un gradiente de deposición de nitrógeno. *Oecologia* 153: 375–384.
- Lamattina L, Garcia Mata C, Graziano M, Pagnussat G. 2003. Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:109–36
- Lauber CL, Strickland MS, Bradford MA, Fierer N. 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biol Biochem* 40: 2407–2415.

- Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N. 2009. Pyro-sequencing based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community composition at the continental scale. *Appl Environ Microbiol* 75: 5111–5120.
- Lambert, J. W., Sum, A. K. 2006. Molecular dynamics study of the properties of capsaicin in an 1 Octanol/Water System. *The Journal of Physical Chemistry* 110, 2351-2357.
- Larsen, J., Jaramillo-López, P., Nájera-Rincon, M., & González-Esquivel, C. 2015. Biotic interactions in the rhizosphere in relation to plant and soil nutrient dynamics. *Journal Of Soil Science And Plant Nutrition*, (ahead), 0-0. doi:10.4067/s0718-95162015005000039
- Leese, F., Steinke, D., Weigand, A., & Penev, L. 2017. Ready for the deluge! Introducing the new Metabarcoding and Metagenomics (MBMG) journal. *Metabarcoding And Metagenomics*, 1, e14791. doi:10.3897/mbmg.1.14791
- Loredo-Osti, C., & López-Reyes, L., & Espinosa-Victoria, D. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*, 22(2), undefined-undefined.
- Lundquist, E., L. Jackson y K. Scow. 1999. Wet dry cycles affect DOC in two California agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 1031-1038.
- Lugtenberg B, Kamilova F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63:541–56
- Ley, R., Harris, J., Wilcox, J., Spear, J., Miller, S., & Bebout, B. et al. 200. Unexpected Diversity and Complexity of the Guerrero Negro Hypersaline Microbial Mat. *Applied And Environmental Microbiology*, 72(5), 3685-3695. doi:10.1128/aem.72.5.3685-3695.2006
- Li, J., Wu, Z.-B., Zhang, Z., Zha, J.-W., Qu, S.-Y., Qi, X.-Z., Ling, F. 2019. Effects of potential probiotic *Bacillus velezensis* K2 on growth, immunity and resistance to *Vibrio harveyi* infection of hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus*♂ × *E. fuscoguttatus*♀). *Fish & Shellfish Immunology*. doi:10.1016/j.fsi.2019.08.047
- Lightbourn, G.J., R.J. Griesbach, J.A. Novotny, B.A. Clevidence, D.D. Rao, and J.R. Stommel. 2008. Effects of anthocyanin and carotenoid combinations on foliage and immature fruit color of *Capsicum annuum*. *J. Hered.* 99:El-Deeb, B., Fayez, K., & Gherbawy, Y. (2013). Isolation and characterization of endophytic bacteria from *Plectranthus tenuiflorus* medicinal plant in Saudi Arabia desert and their antimicrobial activities. *Journal Of Plant Interactions*, 8(1), 56-64. doi: 10.1080/17429145.2012.680077(2):105–111. doi:10.1093/jhered/esm108
- Jones, D. 1992. *The Rhizosphere*. Edited by J. M. Lynch. Chichester, Sussex, UK: John Wiley & Sons, (1990), pp. 458, £65.00, ISBN 0-471-925489. *Experimental Agriculture*, 28(2), 238-238. doi:10.1017/S0014479700019700
- Marín, Alicia, Ferreres F, Francisco A. Tomás-Barberán, Gil. M.I. 2004. Characterization And Quantitation Of Antioxidant Constituents Of Sweet Pepper (*Capsicum Annuum*l. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry* 52 (12): 3861-3869. doi:10.1021/jf0497915.
- Mashiguchi K, Tanaka K, Sakai T, Sugawara S, Kawaide H, et al. 2011. The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108:18512–17
- Matsufuji, Hiroshi, Ishikawa K, Nunomura O, Chino M, and Takeda M. 2007. Anti-Oxidant Content Of Different Coloured Sweet Peppers, White, Green, Yellow, Orange And Red (*Capsicum Annuum* L.). *International Journal Of Food Science & Technology* 42 (12): 1482-1488. doi:10.1111/j.1365-2621.2006.01368.x.

- Mavrodi DV, Blankenfeldt W, Thomashow LS. 2006. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp.: biosynthesis and regulation. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:417–45
- Mejia, L., Hudson, E., Mejia, E., Vazquez, F. 1988. Carotenoid Content and Vitamin A Activity of Some Common Cultivars of Mexican Peppers (*Capsicum annuum*) as Determined by HPLC. *Journal Of Food Science*, 53(5), 1440-1443. doi: 10.1111/j.1365-2621.1988.tb09295.x
- Mhlongo, M., Piater, L., Madala, N., Labuschagne, N., Dubery, I. 2018. The Chemistry of Plant–Microbe Interactions in the Rhizosphere and the Potential for Metabolomics to Reveal Signaling Related to Defense Priming and Induced Systemic Resistance. *Frontiers In Plant Science*, 9. doi: 10.3389/fpls.2018.00112
- Morgan, J.A.W.; Bending, G.D.; White, P.J. Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 2005, 56, 1729–1739.
- Moscone, E.A., M.A. Scaldaferrro, M. Grabiele, N.M. Cecchini, Y. Sánchez García, R. Jarret, J.R. Daviña, D.A. Ducasse, G.E. Barboza, and F. Ehrendorfer. 2007. "The evolution of chili peppers (*capsicum* - *solanaceae*): a cytogenetic perspective". *Acta Horticulturae*, no. 745: 137-170. doi:10.17660/actahortic.2007.745.5.
- Müller, F. M., Werner, K. E., Kasai, M., Francesconi, A., Chanock, S. J., & Walsh, T. J. 1998. *Journal of clinical microbiology*, 36(6), 1625–1629.
- Müller, D. B., Vogel, C., Bai, Y., & Vorholt, J. A. 2016. The Plant Microbiota: Systems-Level Insights and Perspectives. *Annual Review of Genetics*, 50(1), 211–234. doi:10.1146/annurev-genet-120215-034952
- Olatunji, T., & Afolayan, A. 2019. Comparison of nutritional, antioxidant vitamins and capsaicin contents in *Capsicum annuum* and *C. frutescens*. *International Journal Of Vegetable Science*, 1-18. doi: 10.1080/19315260.2019.1629519
- Ongena, M.; Jacques, P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16, 115–125.
- Onyia, C. E., & Anyanwu, C. U. 2013. Comparative study on solubilization of tri-calcium phosphate (TCP) by phosphate solubilizing fungi (PSF) isolated from Nsukka pepper plant rhizosphere and root free soil. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 4(5), 52–57. <https://doi.org/10.5897/JYFR2013.0120>
- Offre, P., Spang, A., & Schleper, C. 2013. Archaea in Biogeochemical Cycles. *Annual Review of Microbiology*, 67(1), 437–457. doi:10.1146/annurev-micro-092412-155614
- Ortiz N, Armada E, Duque E, Roldán, A, Azcón R. 2015. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi and/or bacteria to enhancing plant drought tolerance under natural soil conditions: Effectiveness of autochthonous or allochthonous strains. *Journal of Plant Physiology* 174: 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.08.019>
- Ovando-Martínez, M., Gámez-Meza, N., Molina-Domínguez, C. C., Hayano-Kanashiro, C., & Medina-Juárez, L. A. 2018. Simulated Gastrointestinal Digestion, Bioaccessibility and Antioxidant Capacity of Polyphenols from Red Chiltepin (*Capsicum annuum* L. Var. *glabriusculum*) Grown in Northwest Mexico. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(2), 116–121. doi:10.1007/s11130-018-0669-y
- Patil, S., Bheemaraddi, M. C., and Shivannavar, C. T. 2014. Biocontrol activity of siderophore producing *Bacillus subtilis* CTS-G24 against wilt and dry root rot causing fungi in chickpea. *J. Agric. Vet. Sci.* 7, 63–68

- Patten CL, Blakney AJ, Coulson TJ. 2013. Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. *Crit Rev Microbiol* 39(4):395–415
- Peiffer, J. A., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, S. G., Dangl, J. L., Buckler, E. S., ... Ley, R. E. 2013. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 16, 6548-53.
- Peter john, W.T. y Schlesinger W.H. 1991. Factors controlling denitrification in a Chihuahuan Desert ecosystem. *Soil Science Society of America Journal*, 55: 1694- 1701.
- Perez-Garcia A, Romero D, de Vicente A. 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22:187–93
- Perkins, B., Bushway, R., Guthrie, K. 2002. Determination of capsaicinoids in salsa by liquid chromatography and enzyme Immunoassay. *Journal Association Official Analysis Chemistry* 85, 82-85.
- Pickersgill, B. 1971. Relationships Between Weedy and Cultivated Forms in Some Species of Chili Peppers (Genus capsicum). *Evolution*, 25(4), 683. doi: 10.2307/2406949
- Pickersgill B. 1997. Genetic resources and breeding of Capsicum spp. *Euphytica* 96: 129–133.
- Pickersgill, B. 2007. Domestication of Plants in the Americas: Insights from Mendelian and Molecular Genetics. *Annals Of Botany*, 100(5), 925-940.
- Pikovskaya, R.I. 1948. Mobilization of Phosphorus in Soil Connection with the Vital Activity of Some Microbial Species. *Microbiology*, 17, 362-370.
- Philippot, L. and J. C. Germon. 2005. Contribution of bacteria to initial input and cycling of nitrogen in soils. pp. 159-176. In: F. Buscot and A. Varma (eds.). *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. Soil Biology. Springer-Verlag. Heidelberg, Germany
- Podile A.R., Kishore G.K. 2007. Plant growth-promoting rhizobacteria. In: Gnanamanickam S.S. (eds) *Plant-Associated Bacteria*. Springer, Dordrecht
- Pozo C., O. y Ramírez M., M. 2003. Diversidad e importancia de los chiles silvestres. I.er Simposio Regional sobre Chile Piquín: Avances de investigación en Tecnología de Producción y Uso Racional del Recurso Silvestre. Río Bravo, Tam., México
- Quintero C, M., Castillo, O., Sánchez, P., Marín-Sánchez, J., Guzmán, A., Sánchez, A., & Guzmán, J. 2018. Relieving dormancy and improving germination of Piquín chili pepper (*Capsicum annum* var. *glabriusculum*) by priming techniques. *Cogent Food & Agriculture*, 4(1). doi: 10.1080/23311932.2018.1550275
- R Core Team 2013. R: A language and environment for statistical computing. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Rabbee, M., Ali, M., Choi, J., Hwang, B., Jeong, S., & Baek, K. 2019. *Bacillus velezensis*: A Valuable Member of Bioactive Molecules within Plant Microbiomes. *Molecules*, 24(6), 1046. doi: 10.3390/molecules24061046
- Reilly, C. A., Crouch, D. J.G, Yost, S. 2001. Análisis cuantitativo de capsaicinoides en pimientos frescos, oleorresina pimiento y productos de spray de pimienta. *Journal of Forensic Science* 46, 502-509.

- Reller, L., Weinstein, M., Petti, C. 2007. Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing. *Clinical Infectious Diseases*, 44(8), 1108-1114. doi: 10.1086/512818
- Reyes, I., Bernier, L., Simard, R., Tanguay, P., Antoun, H. 1999. Characteristics of phosphate solubilization by an isolate of a tropical *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28: 291-295.
- Richardson A E 1994 Soil microorganisms and phosphorous availability. In *Soil Biota: Management in Sustainable Farming Systems*. Eds. CE Pankhurst, BM Doube and VVSR Gupta. pp. 50–62. CSIRO, Victoria, Australia
- Rillig MC, Lehmann A, Lehmann J, Camenzind T, Rauh C. 2018. Soil Biodiversity Effects from Field to Fork. *Trends Plant Sci* 23:17 24.
- R. Daniel, “The metagenomics of soil,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 3, no. 6, pp. 470–8, Jun. 2005.
- Rochín-Wong, C.S. 2012. Efecto de los procesos de secado y encurtido tradicional sobre las propiedades antioxidantes de los compuestos fitoquímicos del chiltepin. Ph.D. Diss. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México.
- Rodriguez, H., Gonzalez, T., Selman, G. 2000. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. *J. Biotechnol.* 84:155-161.
- Rodríguez del B., L. A. 2003. Encuestas a Colectores de Chile Piquín y Estudio de Mercado Sobre Preferencias de Chiles en el Noreste de México. Informe Técnico Del Proyecto. I.N.I.F.A.P. México. pp. 26
- Rodríguez del Bosque, L., Sánchez-de la Cruz, R., & Silva Serna, M. 2005. Sunlight effect on development and yield of pequin pepper (*Capsicum annuum* L. var. *aviculare*). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, XI (2), 357-359.
- Rodriguez H, Fraga R, Gonzalez T, Bashan Y. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil* 287:15–21
- Rodríguez-Maturino, A., Valenzuela-Solorio, A., Troncoso-Rojas, R., González-Mendoza O Grimaldo-Juarez M Aviles-Marin L Cervantes-Diaz, D., Grimaldo-Juarez, O., Aviles-Marin z, M., Cervantes-Dia, L. 2012. Antioxidant activity and bioactive compounds of Chiltepin (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) and Habanero (*Capsicum chinense*): A comparative study. *Journal Of Medicinal Plants Research*, 6(9). doi: 10.5897/jmpr11.1576
- Ruiz-Garcia, C., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Llamas, I., & Quesada, E. 2005 *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga, southern Spain. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(1), 191-195. doi: 10.1099/ijms.0.63310-0
- Rooney, A., Price, N., Ehrhardt, C., Swezey, J., & Bannan, J. 2009. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *international journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(10), 2429-2436. doi: 10.1099/ijms.0.009126-0
- Romanazzi, G.; Feliziani, E. 2014. *Botrytis cinerea* (Gray Mold). In *Postharvest Decay: Control Strategies*; Bautista-Banos, S., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands. pp. 131–146. ISBN 9780124115682.
- Russo, V.M. 2012, *Peppers: Botany, Production and Uses*. CABI. Wallingford, Reino Unido.

- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Wei HX, et al. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:4927–32
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Kloepper JW, Pare PW. 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134:1017–26
- Sagoe, C., Ando, T., Kouno, K. and Nagaoka, T. 1998 a. Effects of organic-acid treatment of phosphate rocks on the phosphorus availability to Italian ryegrass. *Soil Sci. Plant Nutr.*43:1067-1072.
- Saha, R.; Saha, N.; Donofrio, R.S.; Bestervelt, L.L. Microbial siderophores: A mini review. *J. Basic Microbiol.* 2013, 53, 303–317.
- Simon, S., & Petrášek, J. 2011. Why plants need more than one type of auxin. *Plant Science*, 180(3), 454-460. doi: 10.1016/j.plantsci.2010.12.007
- Sala, O.E., W.J. Parton, L.A. Joyce y K. Lauenroth. 1988. Primary production of the central grassland regions of the United States. *Ecology* 69: 40-45.
- Sandhya V, Ali SKZ, Grover M, Reddy G, Venkatswarlu B. 2010. Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. *Plant Growth Regul.* 62:21-30.
- Sasse, J.; Martinoia, E.; Northen, T. Feed your friends: Do plant exudates shape the root microbiome? *Trends Plant Sci.* 2018, 23, 25–41.
- Schade, J.D. y S.E. Hobbie. 2005. Spatial and temporal variation in islands of fertility in the Sonoran Desert. *Biogeochemistry*, 73: 541-553.
- Schimel J., K. Van Cleve, R. Cates, T. Clausen y P. Reichardt. 1996. Effects of balsam poplar (*Populus balsamifera*) tannins and low molecular weight phenolics on microbial activity in taiga floodplain soil: implications for changes in N cycling during succession. *Canadian Journal of Botany*, 74: 84-90.
- Schimel, J.P., T.C. Balser y M. Wallenstein. 2007. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology*, 86: 1386-1394.
- Schlesinger, W. H. and W. T. Peterjohn. 1991. Processes controlling ammonia volatilization from Chihuahuan desert soils. *Soil Biol. Biochem.* 23: 637-42.
- Schmidt, J., Bowles, T., & Gaudin, A. 2016. Using Ancient Traits to Convert Soil Health into Crop Yield: Impact of Selection on Maize Root and Rhizosphere Function. *Frontiers In Plant Science*, 7. doi: 10.3389/fpls.2016.00373
- Scoville, W.L. 1912. Note on capsicums. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Doi:10.1002/jps.3080010520
- Seshadri, S., Ignacimuthu, S. and Lakshminarsimhan, C. 2002. Variation of heterotrophic and phosphate solubilizing bacteria from Chennai.Southeast coast of India. *Indian Journal of Marine Sciences*. 31:69-72.
- Shade, A., Gregory, C. J., Handelsman, J., Knight, R., & Fierer, N. 2013). A meta-analysis of changes in bacterial and archaeal communities with time. *The ISME Journal*, 7, 8, 1493-1506.
- Shoresh M, Harman GE, Mastouri F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48:21–43
- Solis-Garza, G. y Espericueta-Betancourt, M. 2005. Utilización y aprovechamiento del mezquite (*Prosopis* spp) en Sonora. *BIOTECNIA*. Vol. VII, No 1. p 11-18.

- Spaepen S, Vanderleyden J, Okon Y. 2009. Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. In *Plant Innate Immunity*, Adv. Bot. Res. 51, ed. LC van Loon, pp. 283–320. London: Academic
- Stepanova AN, Yun J, Robles LM, Novak O, He W, et al. 2011. The Arabidopsis YUCCA1 flavinmonooxygenase functions in the indole-3-pyruvic acid branch of auxin biosynthesis. *Plant Cell* 23:3961–73
- Stepanova, A., & Alonso, J. 2019. From Ethylene-Auxin Interactions to Auxin Biosynthesis and Signal Integration. *The Plant Cell*, 31(7), 1393-1394. doi: 10.1105/tpc.19.00339
- Sun, D., Jiang, X., Wu, Q., & Zhou, N. 2013. Intragenomic Heterogeneity of 16S rRNA Genes Causes Overestimation of Prokaryotic Diversity. *Applied And Environmental Microbiology*, 79(19), 5962-5969. doi:10.1128/aem.01282-13
- Tank, N., Rajendran, N., Patel, B., and Saraf, M. 2012. Evaluation and biochemical characterization of a distinctive pyoverdinin from a *Pseudomonas* isolated from Chickpea rhizosphere. *Braz. J. Microbiol.* 1, 639–648. doi: 10.1590/S1517- 83822012000200028
- Teale, W., Paponov, I., & Palme, K. 2006. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(11), 847-859. doi: 10.1038/nrm2020
- 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.). *Appl. Environ. Microbiol.*37:1016-1024.
- Torsvik, V., & Øvreås, L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion In Microbiology*, 5(3), 240-245. doi:10.1016/s1369-5274(02)00324-7
- Treves D. S. 2010. Review of three DNA analysis applications for use in the microbiology or genetics classroom. *Journal of microbiology & biology education*, 11(2), 186–187. doi:10.1128/jmbe.v11i2.205
- Tripura, C., Sashidhar, B. and Podile, A.R. 2007. Ethyl methanesulphonate mutagenesis-enhanced mineral phosphatesolubilization by groundnut-associated *Serratia marcescens* GPS-5. *Curr Microbiol*54, 79–84.
- Van Spanning, R.J.M., M.J. Delgado y D.J. Richardson. 2005. The nitrogen cycle: Denitrification and its relationship to N₂ fixation. p. 277-342. En: Werner D. y W.E. Newton (eds.). *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment*. Springer. Holand.
- Venturi, V., & Keel, C. 2016. Signaling in the Rhizosphere. *Trends In Plant Science*, 21(3), 187-198. doi: 10.1016/j.tplants.2016.01.005
- Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255, 571-586
- Vejan, P., Abdullah, R. R., Khadiran, T., Ismail, S. and Nasrullah, B. A. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability. *Molecules*, 2016; 21: 573.
- Viñals, F. N., Ortega, R. G., & García, J. C. 1996. *El cultivo de pimientos, chiles y ajíes*. Mundi-Prensa Libros. Madrid, España.
- Virginia, R.A., y W.M. Jarrell. 1983. Soil properties in a mesquite dominated Sonoran Desert ecosystem. *Soil Science Society of America Journal*, 47: 138-144.

- Vitousek, P. M., J. Aber, R. W. Howarth, G. E. Likens, P. A. Matson, D. W. Schindler, W. H. Schlesinger, and G. D. Tilman. 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: causes and consequences. *Ecol. Applic.* 7: 737-750.
- Votava, E., Baral, J., & Bosland, P. 2005. Genetic Diversity of Chile (*Capsicum Annuum* Var. *Annuum* L.) Landraces from Northern New Mexico, Colorado, and Mexico. *Economic Botany*, 59(1), 8-17.
- Wang, L., Lee, F., Tai, C., & Kuo, H. 2008. *Bacillus velezensis* is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(3), 671-675. doi: 10.1099/ijs.0.65191-0
- Wahyuni, Y., A.R. Ballester, E. Sudarmonowati, R.J. Bino y A.G. Bovy. 2011. Biodiversidad de metabolitos en frutos de pimiento (*Capsicum*) de treinta y dos accesiones diversas: variación en compuestos relacionados con la salud e implicaciones para la cría. *Fitoquímica* 72 (11-12): 1358-1370. doi: 10.1016 /j. phytochem.2011.03.016
- Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2) 697-703; DOI: 10.1128/jb.173.2.697-703.19
- Weller DM. 2007. Pseudomonas biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology* 97:250–56
- Whitford, W. G. 2002. *Ecology of desert systems*. Academic Press. Jamestown Road, London, UK.
- Wickham, H. 2016. *ggplot2* (2nd ed., pp. 89-107). New York: Springer International Publishing.
- Won, C., Shen, X., Mashiguchi, K., Zheng, Z., Dai, X., & Cheng, Y. et al. 2011. Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF ARABIDOPSIS and YUCCAs in Arabidopsis. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 108(45), 18518-18523. doi: 10.1073/pnas.1108436108
- Wu, L.; Wu, H.J.; Qiao, J.; Gao, X.; Borriss, R. 2015. Novel routes for improving biocontrol activity of Bacillus based bioinoculants. *Front. Microbiol*, 6, 1–13
- Zafar, M., Abbasi, M., Khan, M., Khaliq, A., Sultan, T., & Aslam, M. 2012. Effect of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Growth, Nodulation and Nutrient Accumulation of Lentil Under Controlled Conditions. *Pedosphere*, 22(6), 848-859. doi: 10.1016/s1002-0160(12)60071-x
- Zamioudis C, Pieterse CMJ. 2012. Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol. PlantMicrobe Interact.* 25:139–50
- Z, Fan-chun, Cheng-wen G, and Li-zhi G. 2014. "The Complete Chloroplast Genome Sequence Of American Bird Pepper (*Capsicum Annuum* var. *Glabriusculum*)". *Mitochondrial DNA* 27 (1): 724-726. doi:10.3109/19401736.2014.913160.
- Zewdie, Y., & Bosland, P. 2001. Capsaicinoid profiles are not good chemotaxonomic indicators for *Capsicum* species. *Biochemical Systematics And Ecology*, 29(2), 161-169. doi: 10.1016/s0305-1978(00)00041-7

ANEXOS

Anexo 1.

Determinación de producción de sideróforos

Preparación de solución Nro. 1

Se utilizó los siguientes reactivos: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA), Cromo azurol S (CAS), Ácido clorhídrico (HCl) y Cloruro férrico (FeCl_3).

Todos los reactivos de ésta solución deben ser preparados justo antes de usar. Se agregó 72.8 mg de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA) en 40 ml de agua destilada. En otro contenedor se agregó 60.5 mg de CAS en 50 ml de agua destilada. En un tercer recipiente se agregó 1 ml de ácido clorhídrico (HCl) 0.1 M en 9 ml de agua destilada, se agregó 27 mg de cloruro férrico (FeCl_3) a la solución de HCl, se mezcló la solución de FeCl_3 -HCl con la de CAS (solución Fe-CAS), después, lentamente y agitando constantemente se agregó la solución Fe-CAS a la de HDTMA,

Preparación de solución Nro. 2

Se utilizó los siguientes reactivos: Fosfato monopotásico (KH_2PO_4), Cloruro de sodio (NaCl), Cloruro de amonio (NH_4Cl), Ácido piperazina-N,N'-bis[2-etanosulfónico] (PIPES) y Agua destilada (dH_2O).

Tabla A1. Lista de reactivos para Preparación de “Solución 2”.

Reactivo	Cantidad
KH_2PO_4	3 g
NaCl	5 g
NH_4Cl	10 g
H_2O	Aforar a 750 mL

Se agregó 30.24 g de PIPES y se ajustó el pH a 6.8, se adicionó 15 g de agar, se aforó a 800 ml, posteriormente se calentó en agitación y se esterilizó en autoclave 15 min a 121 °C y 15 lb de presión.

Se diluyó 75 mL de “Sales Sideróforos Sln. 2” en 675 ml de agua destilada.

Preparación de solución No. 3

Se utilizó los siguientes reactivos: Cloruro de calcio (CaCl_2), Sulfato de manganeso hidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), Ácido bórico (H_3BO_3), Sulfato de cinc hidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Molibdato de sodio hidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Sulfato cúprico hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), sulfato de magnesio hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Manitol, Glucosa y Agua destilada (dH_2O).

Tabla A2. Lista de reactivos para Preparación de “Solución 3”.

Reactivo	Cantidad
CaCl_2	550 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	59 mg
H_3BO_3	70 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	60 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	50 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	71 mg
H_2O	346.5 ml

Se agregó 493 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g de manitol y 2 g de glucosa, en ese orden, se homogenizó y se esterilizó en autoclave 15 min a 121°C y 15 lb de presión, posteriormente se tomó 7 ml de “Sideróforos Sln. 3” y se diluyó en 63 ml de agua destilada.

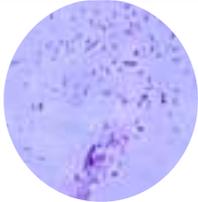
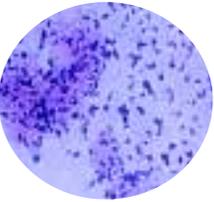
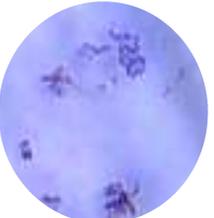
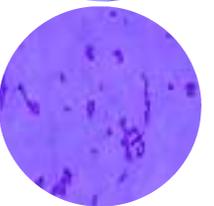
Anexo 2

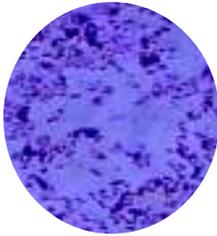
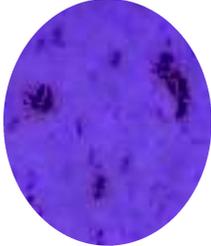
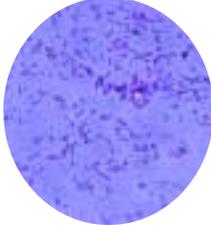
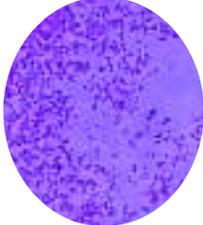
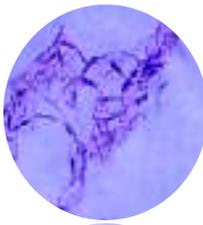
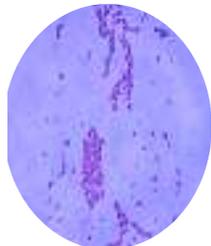
Tabla A3. Ubicación de coordenadas de muestreo realizado en cuatro localidades pertenecientes a cuatro municipios del estado de Sonora.

SITIO	Zonas de muestreos	Puntos de muestreo	COORDENADAS			TIPO DE CHILTEPIN	
			EPOCA SECA	EPOCA DE LLUVIA	EPOCA POST-LLUVIA		
HERMOSILLO (SAN PEDRO EL SAUCITO)	A	1	N 29°12.479' W 110°54.186'	N 29° 12.453' W 110° 54.189'	N 29° 04. 875' W 110°58. 1811'	CULTIVADO	
		2	N 29°12.468' W 110°54.185'	N 29° 12.473' W 110° 54.191'	N 29° 12. 472' W 110°54. 189'	CULTIVADO	
		3	N 29°12.461' W 110°54.178'	N 29° 12.479' W 110° 54.172'	N 29°12. 479' W 110° 54. 172'	CULTIVADO	
	B	1	N 29°12.468' W 110°54.164'	N 29° 12.458' W 110° 54.173'	N 29° 12. 457' W 110° 54. 170'	CULTIVADO	
		2	N 29°12.459' W 110°54.159'	N 29° 12.464' W 110° 54.168'	N 29° 12. 479' W 110° 54. 159'	CULTIVADO	
		3	N 29°12.467' W 110°54.155'	N 29° 12.480' W 110° 54.164'	N 29°12.458' W 110° 54. 162'	CULTIVADO	
	C	1	N 29°12.465' W 110°54.144'	N 29° 12.457' W 110° 54.147'	N 29° 12.458' W 29° 12. 459'	CULTIVADO	
		2	N 29°12.458' W 110°54.136'	N 29° 12.476' W 110° 54.135'	N 29° 12. 473' W 110° 54. 134'	CULTIVADO	
		3	N 29°12.469' W 110°54.130'	N 29° 12.474' W 110° 54.132'	N 29° 12. 460' W 110° 54. 127'	CULTIVADO	
	OPODEPE (MERESICHIC)	A	1	N 30°03.234' W 110°42.871'	N 29° 34.139' W 109° 58.782'	N 30° 03.198' W 110° 43.197'	SILVESTRE
			2	N 30°03.215' W 110°42.910'	N 30° 03.212' W 110° 43.148'	N 30° 03.235' W 110° 42.994'	SILVESTRE
			3	N 30°03.224' W 110°42.927'	N 30° 03.205' W 110° 43.195'	N 30° 03.236' W 110° 42.991'	SILVESTRE
B		1	N 30°03.190' W 110°43.210'	N 30° 03.205' W 110° 43.193'	N 30° 03.235' W 110° 42.995'	SILVESTRE	
		2	N 30°03.199' W 110°43.199'	N 30° 03.231' W 110° 42.967'	N 30° 03.235' W 110° 42.994'	SILVESTRE	
		3	N 30°03.200' W 110°43.196'	N 30° 03.164' W 110° 42.696'	N 30° 03.236' W 110° 42.991'	SILVESTRE	
C		1	N 30°01.056' W 110°40.319'	N 30° 01.072' W 110° 40.324'	N 30° 01.054' W 110° 40.316'	SILVESTRE	
		2	N 30° 01.1042' W 110° 40.291'	N 30° 01.050' W 110° 40.312'	N 30° 01.053' W 110° 40.313'	SILVESTRE	
		3	N 30°01.048' W 110°10.307'	N 30° 01.034' W 110° 40.283'	N 30° 01.049' W 110° 40.311'	SILVESTRE	
D		1	N 30°01.048' W 110°40.311'	N 30° 01.048' W 110° 40.306'	N 30° 01.047' W 110° 40.291'	SILVESTRE	
		2	N 30°01.042' W 110°40.291'	N 30° 01.059' W 110° 40.317'	N 30° 01.1042' W 110° 40.291'	SILVESTRE	

BANAMICHI (RANCHO LAS MORAS)	A	3	N 30°01.032' W 110°40.283'	N 30° 01.054' W 110° 40.321'	N 30° 01.0551' W 110° 40.297'	SILVESTRE	
		1	N 29°58.490' W 110°06.946'	N29° 58. 495' W 110° 06. 942'	N 29° 58.4871' W 110° 06.9471'	SILVESTRE	
		2	N 29°58.478' W 110°06.934'	N29° 58. 487' W 110°06. 946'	N 29° 58.488' W 110° 06.965'	SILVESTRE	
	B	3	N 29°58.487' W 110°06.939'	N 29°58. 457' W 110°06. 537'	N 29° 58.502' W 110° 06.950'	SILVESTRE	
		1	N 29°58.593' W 110°06.731'	N 29°58. 456' W 110°0.6. 537'	N 29° 58.605' W 110° 06.751'	SILVESTRE	
		2	N 29°58.587' W 110°06.734'	N 29°58. 453' W 110°0.6. 535'	N 29° 58.609' W 110° 06.754'	SILVESTRE	
	C	3	N 29°58.605' W 110°06.734'	N 29°58. 453' W 110°06. 536'	N 29° 58.608' W 110° 06.758'	SILVESTRE	
		1	N 29°58.448' W 110°06.517'	N29° 58. 606' W 110°06. 754'	N 29° 58.455' W 110° 06.537'	SILVESTRE	
		2	N 29°58.458' W 110°06.536'	N 29°58. 605' W 110°06. 753'	N 29° 58.454' W 110° 06.536'	SILVESTRE	
	MOCTEZUMA (RANCHO LA MONSTOSA)	A	3	N 29°58.438' W 110°06.531'	N 29° 58. 611' W 110°06. 747'	N 29° 58.452' W 110° 06.535'	SILVESTRE
			1	N 29°34.614' W 109°57.675'	N 29°34. 592' W 109° 57.670'	N 29° 34.633' W 109° 57.639'	SILVESTRE
			2	N 29°34.616' W 109°57.688'	N 29°34. 618' W 109°57. 664'	N 29° 34.628' W 109° 57.665'	SILVESTRE
B		3	N 29°34.612' W 109°57.691'	N 29°34. 622' W 109°57. 665'	N 29° 34.630' W 109° 57.6699'	SILVESTRE	
		1	N 29°34.703' W 109°58.011'	N29° 58. 606' W 110°06. 754'	N 29° 34.702' W 109° 58.011'	SILVESTRE	
		2	N 29°34.703' W 109°57.979'	N 29°34. 702' W 109°57. 975'	N 29° 34.703'W 109° 57.975'	SILVESTRE	
C		3	N 29°34.703' W 109°57.975'	N 29°34. 556' W 109°57. 899'	N 29° 34.558' W 109° 57.901'	SILVESTRE	
		1	N 29°34.270' W 109°58.208'	N 29° 34.269' W 109° 58. 208'	N 29° 34.269' W 109° 58.211'	SILVESTRE	
		2	N 29°34.270' W 109°58.204'	N 29°34. 268' W 109°58. 205'	N 29° 34.270' W 109° 58.270'	SILVESTRE	
			3	N 29°34.267' W 109°58.941'	N 29°34. 134' W 109 °58. 782'	N 29° 34.268' W 109° 58.936'	SILVESTRE

Tabla A4. Características microscópicas y macroscópicas de las cepas bacterianas de interés.

ID Cepa		Microscopia		Macroscopia
1SP2C	Bacilo Gram-negativo		Superficie lisa, borde regular, color rosa claro dependiente de temperatura, opaco	
3SP2A	Bacilo Gram-positivo, esporulado.		Superficie plana, borde irregular, color amarillo caro, opaca.	
2SP3A	Bacilo Gram-positivo, esporulado.		Superficie plana, borde irregular, color amarillo caro, opaca.	
4SP3A	Bacilo Gram-positivo, esporulado.		Superficie plana, borde irregular, color amarillo caro, opaca.	
2OP2C	Bacilo Gram-positivo, esporulado.		Superficie plana, borde irregular, color amarillo caro, opaca.	
3OP2C	Bacilo Gram-positivo, esporulado.		Superficie plana, borde regular, color amarillo, opaca.	
4OP2B	Bacilo Gram-negativo		Superficie lisa, borde regular, color rosa claro dependiente de temperatura, opaco	

10OP3B	Bacilo Gram-positivo, esporulado.		Superficie plana, borde irregular, color amarillo caro, opaca.	
4BAN2A	Bacilo Gram-positivo, esporulado.		Superficie plana, borde irregular, color amarillo caro, opaca.	
1BAN3A	Bacilo Gram-positivo, esporulado.		Superficie plana, borde irregular, color amarillo caro, opaca.	
19BAN3C	Coco Gram-positivo		Superficie plana, borde regular, color amarillo Traslúcida.	
3MOC2A	Bacilo Gram-positivo, esporulado.		Superficie plana, borde regular, color amarillo, opaca.	
10MOC2B	Bacilo Gram-negativo		Superficie plana, borde regular, color verde fluorescente, transparente.	
12MOC2B	Bacilo Gram-negativo		Superficie lisa, borde irregular, color rosa, opaco	

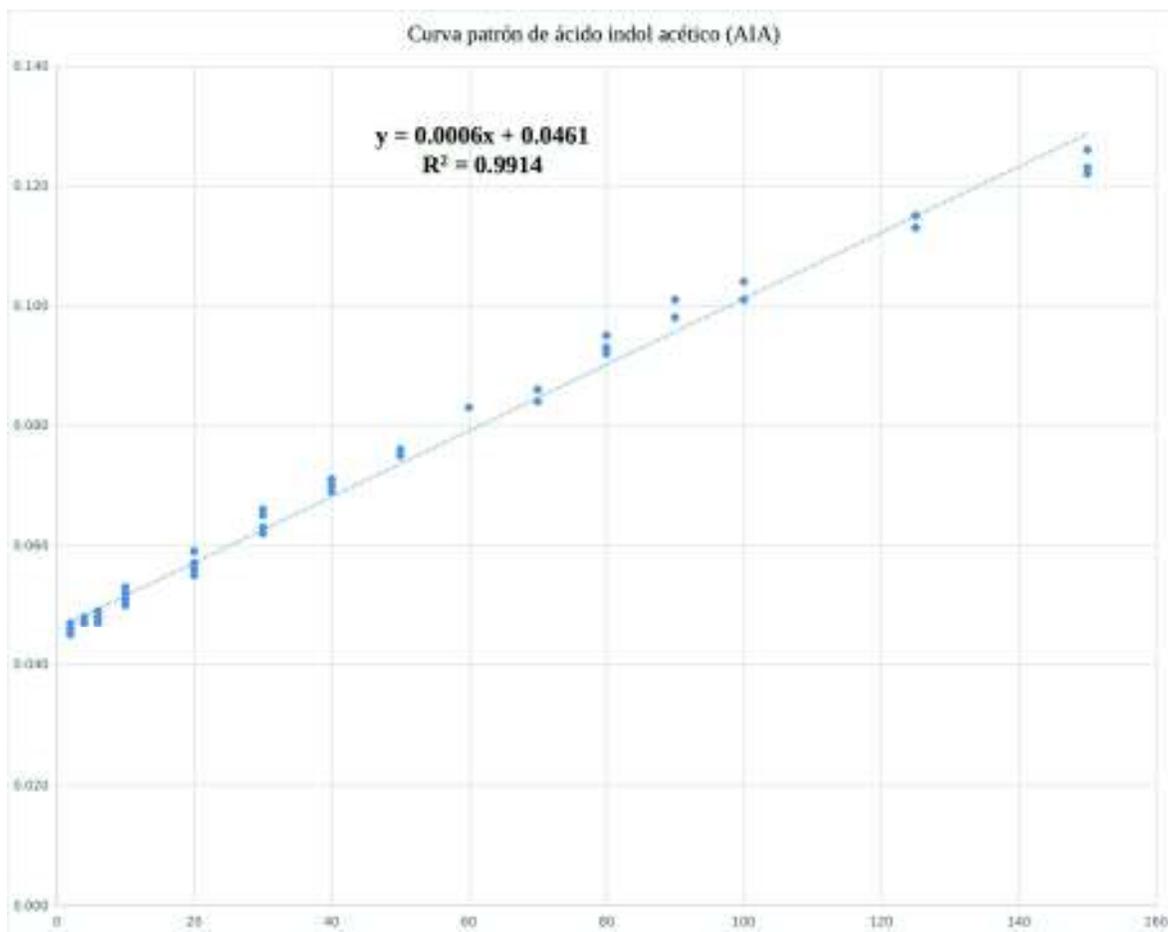


Figura A1. Curva patrón de ácido indolacético (AIA), a diferentes concentraciones de un estándar.

Tabla A5. Bacterias identificadas promotoras del crecimiento vegetal con sus respectivas determinaciones de producción de ácido indolacético, solubilización de fosfato y producción de sideróforos.

ID	Nombre de secuencia	Organismo descrito de alta similitud y secuencia de referencia en NCBI	Índoles (ppm)	Fosfatos (IES)	Sideróforos (IEP)
1	1SP2C	NR_044385.1 <i>Serratia nematodiphila</i> DZ0503SBS1	9.38±0.98	1.81±0.20	1.17±0.07
2	3SP2A	NR_075005.2 <i>Bacillus velezensis</i> strain FZB42	7.36±1.61	1.19±0.11	1.03±0.01
3	2SP3A	NR_075005.2 <i>Bacillus velezensis</i> strain FZB42	7.80±0.77	1.51±0.02	1.08±0.02
4	4SP3A	NR_075005.2 <i>Bacillus velezensis</i> strain FZB42	8.071±1.44	1.47±0.11	1.31±0.07
5	2OP2C	NR_075005.2 <i>Bacillus velezensis</i> strain FZB42	8.12±1.34	1.35±0.08	1.04±0.04
6	3OP2C	NR_114108.1 <i>Kluyvera cryocrescens</i> strain NBRC 102467	7.53±1.17	1.63±0.10	1.14±0.06
7	4OP2B	NR_044385.1 <i>Serratia nematodiphila</i> DZ0503SBS1	7.39±1.37	1.50±0.06	1.09±0.03
8	10OP3B	NR_075005.2 <i>Bacillus velezensis</i> strain FZB42	9.51±0.93	2.16±0.27	2.16±0.27
9	4BAN2A	NR_075005.2 <i>Bacillus velezensis</i> strain FZB42	8.64±0.70	8.57±1.72	1.03±0.63
10	1BAN3A	NR_075005.2 <i>Bacillus velezensis</i> FZB42	8.30±2.40	6.22±1.43	1.19±0.05
11	19BAN3C	NR_119280.1 <i>Enterococcus casseliflavus</i> strain NCIMB 11449	5.91±0.98	2.57±0.81	1.59±0.09
12	3MOC2A	NR_074540.1 <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	6.52±0.64	3.09±0.45	1.20±0.03
13	10MOC2B	NR_114194.1 <i>Pseudomonas citronellolis</i> strain NBRC 103043	5.91±2.09	4.69±0.84	1.51±0.20
14	12MOC2B	NR_113236.1 <i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> ATCC 13880	6.28±0.21	2.19±0.43	1.21±0.06