

Response of *Zea mays* var. Jala to *Burkholderia* sp. and *Klebsiella oxytoga* under reduced urea dose

Respuesta de *Zea mays* var. Jala a *Burkholderia* sp. y *Klebsiella oxytoga* bajo dosis reducida de urea

Dieter Plata-Guzmán; Juan Luis Ignacio-de la Cruz;
Juan Carlos Carrillos-Amezcuat; Juan Manuel Sánchez-Yáñez*

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Francisco J. Mujica s/n, col. Felicitas del Rio, Morelia, Michoacán, C. P. 58000, MÉXICO.

*Corresponding author: syanez@umich.mx, tel. 443 322 35 00, ext. 4240.

Abstract

Introduction: The growing of maize (*zea mays* L.) in Latin America is carried out under the intensive production system, which causes loss of soil fertility due to excessive nitrogen fertilizer.

Objective: Analyzing the response of maize var. Jala to genera of plant growth promoting bacteria (PGPB) endophytes of maize var. Mexicana (teocintle) when using nitrogen fertilizer such as urea at 50 % under greenhouse and soil conditions.

Methodology: A randomized block design was established with five treatments, three controls and twenty repetitions. The treatments with inoculated maize seeds and 50 % urea were: *Burkholderia* (KO) and *Burkholderia* sp. 14 (B14); the controls were: non-inoculated maize with 50 % urea (RC1), non-inoculated maize irrigated with water (FC) and non-inoculated maize with 100 % urea (RC2). The experiments were established under greenhouse and soil conditions. The response variables were radical dry weight (RDW) and fresh weight of grain (FWG). ANOVA and Tukey's mean comparison ($P \leq 0.01$) were carried out.

Results: In both environments, treatment B14 showed statistically higher values than those obtained with FC (full control), but statistically equal to RC2 (relative control).

Study limitations: Maize varieties have specific and beneficial endophytic PGPB genera, which are not necessarily for regional varieties.

Originality: PGPB endophytes from *teocintle* (ancestor of maize) were used because of their close genetic relationship with the maize var. Jala.

Conclusion: PGPB endophytes from *teocintle* are a viable option for sustainable maize production.

Resumen

Introducción: El cultivo de maíz (*zea mays* L.) en Latinoamérica se realiza bajo el sistema de producción intensiva, lo que causa pérdida de fertilidad del suelo debido al exceso de fertilizante nitrogenado.

Objetivo: Analizar la respuesta del maíz var. Jala a géneros de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BAPOCEVE) endófitas de maíz var. Mexicana (teocintle) al utilizar fertilizante nitrogenado como urea al 50 % en invernadero y campo.

Metodología: Se estableció un diseño de bloques al azar con cinco tratamientos, tres testigos y veinte repeticiones. Los tratamientos con semillas de maíz inoculadas y urea al 50 % fueron: *Burkholderia* sp. 5 (B5), *Burkholderia* sp. 9 (B9), *Burkholderia cepacia* ATTC 25416 (BC), *Klebsiella oxytoga* (KO) y *Burkholderia* sp. 14 (B14); los testigos fueron: maíz no inoculado con urea al 50 % (CR1), maíz no inoculado e irrigado con agua (CA) y maíz sin inocular con urea al 100 % (CR2). Los experimentos se establecieron en campo e invernadero. Las variables respuesta fueron: peso seco radical (PSR) y peso fresco del grano (PFG). Se realizaron ANOVA y comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.01$).

Resultados: En ambos ambientes, el tratamiento B14 presentó valores estadísticamente superiores a los obtenidos con CA (control absoluto), pero estadísticamente iguales al CR2 (control relativo).

Limitaciones del estudio: En variedades de maíz existen géneros de BAPOCEVE específicos y benéficos, que no necesariamente lo son para variedades regionales.

Originalidad: Se emplearon BAPOCEVE endófitas del teocintle por su estrecha relación genética con el maíz var. Jala.

Conclusión: Las BAPOCEVE endófitas del teocintle son una opción viable para la producción sustentable de maíz.

Keywords: maize, soil, hyper fertilization, *teocintle*, endophyte bacteria genera, phytohormones.

Palabras clave: maíz, suelo, hiperfertilización, teocintle, géneros de bacterias endófitas, fitohormonas.

Please cite this article as follows (APA 6): Plata-Guzmán, D., Ignacio-de la Cruz, J. L., Carrillos-Amezcuat, J. C., & Sánchez-Yáñez, J. M. (2020). Response of *Zea mays* var. Jala to *Burkholderia* sp. and *Klebsiella oxytoga* under reduced urea dose. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*, 12(2), 173-182. doi: 10.5154/r.inagbi.2019.10.070

Received: October 7, 2019 / Accepted: October 16, 2020.



Ingeniería Agrícola
y Biosistemas

www.chapingo.mx/revistas/inagbi

Introduction

At present, a challenge for Latin America is to maintain the growing demand for maize (*zea mays* L.) through the intensive production system (Hernández et al., 2015). Usually, high doses of nitrogen fertilizer (NIFE) are applied to the soil, causing soil deterioration, with additional risk of contaminating surface and groundwater (Cárdenas-Navarro, Sánchez-Yáñez, Farías-Rodríguez, & Peña-Cabriales, 2004). Mostly, nitrogen hyperfertilization increases the production cost of maize grain, so an alternative to regulate and optimize the application of NIFE is to inoculate maize seeds with plant growth promoting bacteria (PGPB) endophytes of maize var mexicana (teocintle). If the above is combined with the reduction of the NIFE dose at 50 %, the loss of soil fertility can be avoided (Moreno-Reséndez, García-Mendoza, Reyes-Carrillo, Vásquez-Arroyo, & Cano-Ríos, 2018; Pedraza et al., 2010).

The literature reports a wide range of PGPB genera, which are sold commercially for maize seed: *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus polymyxa* (Gutiérrez-Mañero, Ramos-Solano, Mehouchi, Tadeo, & Talon, 2001), *Pseudomonas putida* (Kurek & Jaroszuk-Ścisiel, 2003; Valdivia-Uridales, Fernández-Brondo, & Sánchez-Yáñez, 1999) and *Burkholderia cepacia* (Riggs, Chelius, Iniguez, Kaeppler, & Triplett, 2001). Like *Azospirillum lipoferum* and *Azotobacter brasilense* (Bashan, 1998), these genera allow the reduction of the NIFE dose and its optimization in the roots without affecting the healthy growth of the (Loredo-Osti, López-Reyes, & Espinosa-Victoria, 2004; Martínez-Viveros, Jorquera, Crowley, Gajardo, & Mora, 2010). However, these bacteria are specific and beneficial for certain varieties of maize, but not for all the varieties planted in the world; in addition, not all of them allow the reduction and optimization of the NIFE dose by up to 50 % (Massena-Reis, Ivo-Baldani, Divan-Baldani, & Dobereiner, 2000).

This study analyzed the application of PGPB endophytes of teocintle due to its close genetic relationship with domestic maize (Carcaño-Montiel, Ferrera-Cerrato, Pérez-Moreno, Molina-Galán, & Bashan, 2006; Eubanks, 2001; Galinat, 2001). Specifically, because teocintle faces environments not suitable for healthy growth, such as nutritional and water stress, and tolerance to a wide range of phytopathogenic agents. These characteristics are encoded in the genome of the teocintle, which helps it to reproduce in nature without human protection. Another biological factor that facilitates the adaptability of teocintle in complex environments is the positive interaction of this gramineous with beneficial microorganisms inside and outside its plant tissues or organs (Castellanos-Morales, Villegas, Cárdenas-Navarro, Farías-Rodríguez, & Sánchez-Yáñez, 2005). Based on the above, the

Introducción

En la actualidad, un reto de Latinoamérica es mantener la creciente demanda de maíz (*zea mays* L.) mediante el sistema de producción intensiva (Hernández et al., 2015). Normalmente, se aplican al suelo altas dosis de fertilizante nitrogenado (FENI), lo que causa deterioro del suelo, con riesgo adicional de contaminar las aguas superficiales y subterráneas (Cárdenas-Navarro, Sánchez-Yáñez, Farías-Rodríguez, & Peña-Cabriales, 2004). Generalmente, la hiperfertilización nitrogenada eleva el costo de producción del grano de maíz, por lo que una alternativa para regular y optimizar la aplicación del FENI es inocular las semillas de maíz con géneros de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BAPOCEVE) endófitas de maíz var. Mexicana (teocintle). Si se combina lo anterior con la reducción de la dosis del FENI al 50 % se puede evitar la pérdida de fertilidad del suelo (Moreno-Reséndez, García-Mendoza, Reyes-Carrillo, Vásquez-Arroyo, & Cano-Ríos, 2018; Pedraza et al., 2010).

En la literatura se reporta un amplio grupo de géneros de BAPOCEVE, los cuales se venden comercialmente para semillas de maíz: *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus polymyxa* (Gutiérrez-Mañero, Ramos-Solano, Mehouchi, Tadeo, & Talon, 2001), *Pseudomonas putida* (Kurek & Jaroszuk-Ścisiel, 2003; Valdivia-Uridales, Fernández-Brondo, & Sánchez-Yáñez, 1999) y *Burkholderia cepacia* (Riggs, Chelius, Iniguez, Kaeppler, & Triplett, 2001). Al igual que *Azospirillum lipoferum* y *Azotobacter brasilense* (Bashan, 1998), dichos géneros permiten la reducción de la dosis del FENI y su optimización en las raíces sin afectar el sano crecimiento de la gramínea (Loredo-Osti, López-Reyes, & Espinosa-Victoria, 2004; Martínez-Viveros, Jorquera, Crowley, Gajardo, & Mora, 2010). Sin embargo, estas bacterias son específicas y benéficas para ciertas variedades de maíz, pero no para todas las sembradas en el mundo; además, no todas permitan la reducción y optimización de la dosis del FENI hasta en un 50 % (Massena-Reis, Ivo-Baldani, Divan-Baldani, & Dobereiner, 2000).

En esta investigación se analizó la aplicación de BAPOCEVE endófitas de teocintle debido a su estrecha relación genética con el maíz doméstico (Carcaño-Montiel, Ferrera-Cerrato, Pérez-Moreno, Molina-Galán, & Bashan, 2006; Eubanks, 2001; Galinat, 2001). En específico, porque el teocintle enfrenta ambientes no propicios para un crecimiento sano, como el estrés nutricional e hídrico, y la tolerancia a un amplio grupo de agentes fitopatógenos. Estas características están codificadas en el genoma del teocintle, lo que le ayuda a reproducirse en la naturaleza sin la protección humana. Otro factor biológico que facilita la capacidad de adaptación del teocintle en ambientes complejos es la interacción positiva de esta gramínea con microorganismos benéficos en el

objective of this research was to analyze the response of the maize var. Jala to *Burkholderia* sp. and *Klebsiella oxitogena*, teocintle endophytes, when using nitrogen fertilizer such as urea at 50 % under greenhouse and soil conditions.

Materials and methods

Origin of *Burkholderia* sp. and *Klebsiella oxitogena*

The endophytic PGPB used in this study were isolated from teocintle obtained from specimens collected on the banks of Lake Cuitzeo, Michoacán, Mexico. The collected plants with soil and roots were preserved in an icebox at 15 °C for 2 h and were transported to the Environmental Microbiology Laboratory at the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, Mexico. To obtain the bacteria, the roots, stem and leaves were disinfected with 10 % NaClO for 2.5 min, were washed six times with sterile drinking water, cut into 5 cm pieces, ground and suspended in 9 mL of detergent saline solution at 0.85 %; later, planted in 0.1 mL *Pseudomonas cepacia azelaic acid tryptamine* (PCAT) agar with the following chemical composition (g·L⁻¹): 0.1 de MgSO₄, 0.20 of azelaic acid, 0.2 of tryptamine (dissolved in 2 mL of absolute alcohol), 4 of K₂HPO₄, 4 of KH₂PO₄ and 0.02 of yeast extract; the pH of the agar was adjusted to 5.7 (Sánchez-Yáñez, 2007). Teocintle tissues or organs sown in PCAT were incubated at 28 °C for 72 h; during this time colonies of different species of *Burkholderia* sp. and *K. oxytogenic* appeared. The identification of *Burkholderia* sp. was carried out by morphological comparison of the colonial and microscopic with *B. cepacia* ATTC2541, or reference strain, according to the criteria of Bergey's Manual and the system API 50 CH (BioMérieux, France) (Holt, 1994). *K. oxytogen*a was identified based on the criteria of the Bergey Manual (Castellanos-Morales, Villegas, Cárdenas-Navarro, Farías-Rodríguez, & Sánchez-Yáñez, 2005; Holt, 1994).

Table 1 shows that the content of ammoniacal N in soil was low, so the NIFE dose was adjusted to the recommended for maize varieties grown in that area of Mexico. Maize inoculation with *Burkholderia* sp. and *K. oxytogen*a was based on the fact that both bacteria synthesize acid and alkaline phosphatases that solubilize PO₄³⁻ (phosphates) from the soil and optimize the NIFE in maize (Guerrero, 1990; Vallejo-Delgado, Ramírez-Díaz, Chuela-Bonaparte, & González-Íñiguez, 2004).

Inoculation of maize var. Jala under greenhouse conditions

For this study, a randomized block experimental design with five treatments, three controls and twenty

interior y exterior de sus tejidos u órganos vegetales (Castellanos-Morales, Villegas, Cárdenas-Navarro, Farías-Rodríguez, & Sánchez-Yáñez, 2005). Con base en lo anterior, el objetivo de esta investigación fue analizar la respuesta del maíz var. Jala a *Burkholderia* sp. y *Klebsiella oxitogena*, endófitas de teocintle, al utilizar fertilizante nitrogenado como urea al 50 % en invernadero y campo.

Materiales y métodos

Origen de *Burkholderia* sp. y *Klebsiella oxitogena*

Las BAPOCEVE utilizadas en este trabajo se aislaron de teocintle obtenido de ejemplares colectados en las riveras del Lago de Cuitzeo, Michoacán, México. Las plantas colectas con suelo y raíces se conservaron en una hielera a 15 °C por 2 h, y se transportaron al Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México. Para la obtención de las bacterias, las raíces, el tallo y las hojas se desinfectaron con NaClO al 10 % por 2.5 min, se lavaron seis veces con agua potable estéril, se cortaron en trozos de 5 cm, se trituraron y se suspendieron en 9 mL de solución salina detergente al 0.85 %; después, se sembraron 0.1 mL en agar *Pseudomonas cepacia* ácido ázelaico triptamina (PCAT) con la siguiente composición química (g·L⁻¹): 0.1 de MgSO₄, 0.20 de ácido ázelaico, 0.2 de triptamina (disuelta en 2 mL de alcohol absoluto), 4 de K₂HPO₄, 4 de KH₂PO₄ y 0.02 de extracto de levadura; el pH del agar se ajustó a 5.7 (Sánchez-Yáñez, 2007). Los tejidos u órganos del teocintle sembrados en PCAT se incubaron a 28 °C por 72 h; durante este tiempo aparecieron las colonias de diferentes especies de *Burkholderia* sp. y *K. oxitogena*. La identificación de *Burkholderia* sp. se realizó por comparación morfológica de la colonial y microscópica con *B. cepacia* ATTC2541, o cepa de referencia, de acuerdo con los criterios del Manual de Bergey y el sistema API 50 CH (BioMérieux, Francia) (Holt, 1994). *K. oxitogena* se identificó con base en los criterios del Manual de Bergey (Castellanos-Morales, Villegas, Cárdenas-Navarro, Farías-Rodríguez, & Sánchez-Yáñez, 2005; Holt, 1994).

En el Cuadro 1 se muestra que el contenido de N amoniacal en suelo era bajo, por lo que se ajustó la dosis de FENI a la recomendada para las variedades de maíz cultivadas en esa zona México. La inoculación de maíz con *Burkholderia* sp. y *K. oxitogena* se basó en que ambas bacterias sintetizan fosfatasa ácida y alcalinas que solubilizan PO₄³⁻ (fosfatos) del suelo y optimizan el FENI en maíz (Guerrero, 1990; Vallejo-Delgado, Ramírez-Díaz, Chuela-Bonaparte, & González-Íñiguez, 2004).

replications was established. The treatments with a dose of 50 % urea were: maize with *Burkholderia* sp. 5 (B5), maize with *Burkholderia* sp. 9 (B9), maize with *Burkholderia cepacia* ATTC 25416 (BC), maize with *Klebsiella oxitogena* (KO) and maize with *Burkholderia* sp. 14 (B14); on the other hand, the controls were: non-inoculated maize with a 50 % urea dose (RC1), non-inoculated maize irrigated with water (FC) and non-inoculated maize with a 100 % urea dose (RC2). The maize seeds were disinfected with 0.2 % NaClO for 5 min, washed with sterile drinking water for 5 min, with 70 % (v/v) alcohol for 5 min and finally washed six times with sterile drinking water. Subsequently, the seeds of maize var. Jala were inoculated with 30×10^4 UFC·mL⁻¹·seed⁻¹ of each PGPB, and then three inoculated seeds were sown per pot in sterile sand. After germination, two plants were left per pot, and the surface was covered with sterile sawdust.

The maize plants were fed three times a week for 40 days with a mineral solution with the following chemical composition (g·L⁻¹): 5 of NH₄NO₃, 2.5 of K₂HPO₄, 2 of KH₂PO₄, 1 of MgSO₄, 1 of NaCl, 1 of CaCl₂, traces of FeSO₄ and 10 mL·L⁻¹ of trace element solution (2.86 g·L⁻¹ of H₃BO₃, 0.22 g·L⁻¹ of ZnSO₄·7H₂O and 1.81 g·L⁻¹ of MgCl₂·7H₂O, with pH adjusted to 6.8). In this case, the only response variable was the radical dry weight (RDW); this is because under greenhouse conditions it was possible to observe the rapid positive response of maize to PGPB with the urea dose reduced to 50 %,

Inoculación de maíz var. Jala en invernadero

Para este ensayo se estableció un diseño experimental de bloques al azar con cinco tratamientos, tres testigos y veinte repeticiones. Los tratamientos con una dosis de urea al 50 % fueron: maíz con *Burkholderia* sp. 5 (B5), maíz con *Burkholderia* sp. 9 (B9), maíz con *Burkholderia cepacia* ATTC 25416 (BC), maíz con *Klebsiella oxitogena* (KO) y maíz con *Burkholderia* sp. 14 (B14); por su parte, los testigos fueron: maíz no inoculado con dosis de urea al 50 % (CR1), maíz no inoculado e irrigado con agua (CA) y maíz sin inocular con dosis de urea al 100 % (CR2). Las semilla de maíz se desinfectaron con NaClO al 0.2 % por 5 min, se lavaron con agua potable estéril por 5 min, con alcohol al 70 % (v/v) por 5 min y, finalmente, se lavaron seis veces con agua potable estéril. Posteriormente, las semillas de maíz var. Jala se inocularon con 30×10^4 UFC·mL⁻¹·semilla⁻¹ de cada BAPOCEVE, y luego se sembraron tres semillas inoculadas por maceta en arena estéril. Después de la germinación, se dejaron dos plantas por maceta, y la superficie se cubrió con aserrín estéril.

Las plantas de maíz se alimentaron tres veces por semana durante 40 días con una solución mineral con la siguiente composición química (g·L⁻¹): 5 de NH₄NO₃, 2.5 de K₂HPO₄, 2 de KH₂PO₄, 1 de MgSO₄, 1 de NaCl, 1 de CaCl₂, trazas de FeSO₄ y 10 mL·L⁻¹ de solución oligoelementos (2.86 g·L⁻¹ de H₃BO₃, 0.22 g·L⁻¹ de ZnSO₄·7H₂O y 1.81 g·L⁻¹ de MgCl₂·7H₂O, con pH ajustado a 6.8). En este caso, la única variable respuesta fue el

Table 1. Physical-chemical properties of soil used under greenhouse and soil conditions.
Cuadro 1. Propiedades físico-químicas del suelo utilizado en invernadero y campo.

Parameter / Parámetro	Value / Valor
pH (1:20)	5.55
Organic matter (%) / Material orgánica (%)	2.1
Texture (%) / Textura (%)	42.1 (clay), 54 (sand), 3.8 (silt) / 42.1 (arcilla), 54 (arena), 3.8 (limo)
Cation exchange capacity / Capacidad de intercambio catiónico	
K (%)	3.29
Ca (%)	32.5
Mg (%)	60.25
Total organic nitrogen (kg·ha ⁻¹) / Nitrógeno orgánico total (kg·ha ⁻¹)	53.4
Ammonia nitrogen (ppm) / Nitrógeno amoniacal (ppm)	6.5
Mineral nitrogen (ppm) / Nitrógeno mineral (ppm)	44.2
Soluble phosphorus (ppm) / Fósforo soluble (ppm)	20.37
Moisture saturation percentage (%) / Porcentaje de saturación de humedad (%)	40.7
Field capacity (%) / Capacidad de campo (%)	23.2

without having to wait until physiological maturity (Sánchez-Yáñez, 2007).

Inoculation of maize var. Jala under soil conditions

The experimental design used in this case was the same as the previous one. The sowing was carried out in a 800 m² plot located in the facilities of the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia “La Posta” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Tarímbaro, Michoacán, Mexico. Maize seeds were disinfected as previously described, and then wetted with a 10 % (w/v) sucrose solution and inoculated with 3×10^6 UFC·mL⁻¹·seed⁻¹.

Maize seeds were sown under soil conditions at a depth of between 7 and 30 cm due to the type of soil (clay-sandy texture). The soil was prepared with a tractor in the usual way for the cultivation of maize var. Jala: harrow furrow, field border. The design of the experimental plots was 5 x 4 m, with a total area of 20 m² and a separation of 1 m between plots, each one with five furrows; of these, only the central ones were used for sampling. The NIFE doses used were: 0, 140 and 280 kg·ha⁻¹, equivalent to 0, 50 and 100 % of that recommended for maize in that area. Two applications of NIFE were made: one in the first weeding and another when filling the grain (Vallejo-Delgado et al., 2004). The response variables analyzed were the PSR (40 days after sowing) and the dry weight of the grain (DWG; 180 days after sowing) (Sánchez-Yáñez, 2007). The DWG was analyzed because under soil conditions, and under the conditions provided, it was possible to reach physiological maturity, which is when grains represent 50 % of the total weight of the aerial part of the plant, which is due to the fact that maize undergoes a remobilization and translocation of carbohydrates and other nutrients (Sánchez-Yáñez, 2007).

The experimental data were subjected to an analysis of variance and a comparison of Tukey means ($P \leq 0.01$), using the statistical program Statgraphics Centurion (García-González, Farías-Rodríguez, Peña-Cabriales, & Sánchez-Yáñez, 2005).

Results and discussion

Figure 1 shows the response of maize var. Jala under greenhouse conditions, and it can be seen that treatment B14 had a positive effect by presenting a PSR value without significant statistical difference compared to the control RC2, both with values of 0.7496 g. Both B14 and RC2 were statistically different from the rest of the treatments. The positive response of maize to PGPB indicates that *Burkholderia* sp. and *K. oxytoga*, by colonizing the interior of the root primordia and normal roots, converted some organic

peso seco radical (PSR); esto debido a que en condiciones de invernadero fue posible observar la rápida respuesta positiva del maíz a las BAPOCEVE con la dosis de urea reducida al 50 %, sin tener que esperar hasta la madures fisiológica (Sánchez-Yáñez, 2007).

Inoculación de maíz var. Jala en campo

En este ensayo, el diseño experimental usado fue igual al anterior. La siembra se realizó en una parcela de 800 m² ubicada en las instalaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia “La Posta” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Tarímbaro, Michoacán, México. Las semillas de maíz se desinfectaron como se describió previamente, y después se humedecieron con una solución de sacarosa al 10 % (p/v) e inocularon con 3×10^6 UFC·mL⁻¹·semilla⁻¹.

Las semillas de maíz se sembraron en campo a una profundidad de entre 7 y 30 cm debido al tipo de suelo (textura arcillo-arenosa). El terreno se preparó con tractor de la forma acostumbrada para el cultivo de maíz var. Jala: rastra, surcado y bordeado. El diseño de las parcelas experimentales fue de 5 x 4 m, con una superficie total de 20 m² y una separación de 1 m entre parcela, cada una con cinco surcos; de éstos, únicamente se usaron los centrales para el muestreo. Las dosis de FENI utilizadas fueron: 0, 140 y 280 kg·ha⁻¹, equivalentes a 0, 50 y 100 % de la recomendada para maíz de esa zona. Se realizaron dos aplicaciones del FENI: una en la primera escarda y otra al llenado del grano (Vallejo-Delgado et al., 2004). Las variables respuesta analizadas fueron: el PSR (a los 40 días después de la siembra) y el peso seco del grano (PSG; a los 180 días después de la siembra) (Sánchez-Yáñez, 2007). Se analizó el PSG debido a que en condiciones de campo, y bajo las condiciones proporcionadas, fue posible alcanzar la madurez fisiológica, que es cuando los granos representan el 50 % del peso total de la parte aérea de la planta, lo cual se debe a que el maíz experimenta una removilización y translocación de carbohidratos y otros nutrientes (Sánchez-Yáñez, 2007).

Los datos experimentales se sometieron a una análisis de varianza y una comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.01$), para lo cual se utilizó el programa estadístico Statgraphics Centurion (García-González, Farías-Rodríguez, Peña-Cabriales, & Sánchez-Yáñez, 2005).

Resultados y discusión

La Figura 1 muestra la respuesta del maíz var. Jala en invernadero, y se puede apreciar que el tratamiento B14 tuvo un efecto positivo al presentar un valor del PSR sin diferencia estadística significativa en comparación con el testigo CR2, ambos con valores de 0.7496 g. Tanto B14 como CR2 fueron estadísticamente diferentes al

compounds, such as amino acids of plant metabolism, into auxin-type phytohormones that promoted root multiplication, which, in turn, increased the capacity of mineral exploration and absorption, and thus optimized the dose of NIFE reduced to 50 % (Berendsen, Pieterse, & Bakker, 2012; Carcaño-Montiel et al., 2006).

Figure 2 shows that under soil conditions, the positive response of treatment B14, with a PSR of 0.8976 g, showed no statistical difference with B9, RC2 or KO. The control FC recorded the lowest numerical value and was statistically different from the rest of the treatments. The growth of B14 was equivalent to that recorded with RC2, which is the control without inoculation.

The positive response of maize suggests that the PGPB endophytes of teocintle first lived long enough after inoculation of seeds (Moreno-Reséndez et al, 2018), and then reproduced in the seed spermosphere during germination and subsequently colonized the

resto de los tratamientos. La respuesta positiva del maíz a las BAPOCEVE indica que *Burkholderia* sp. y *K. oxitogena*, al colonizar el interior del primordio de raíz y las raíces normales, convirtieron algunos compuestos orgánicos, como aminoácidos del metabolismo vegetal, en fitohormonas del tipo auxinas que promovieron la multiplicación de las raíces, las cuales, a su vez, aumentaron la capacidad de exploración y absorción mineral, y con ello optimizaron la dosis del FENI reducida al 50 % (Berendsen, Pieterse, & Bakker, 2012; Carcaño-Montiel et al., 2006).

En la Figura 2 se observa que a nivel de campo la respuesta positiva del tratamiento B14, con un PSR de 0.8976 g, no presentó diferencia estadística con B9, CR2 ni KO. El testigo CA registró el valor numérico más bajo y estadísticamente diferente al resto de los tratamientos. El crecimiento de B14 fue equivalente al registrado con CR2, que es el testigo sin inocular.

La respuesta positiva del maíz sugiere que los géneros de BAPOCEVE endófitas de teocintle primero vivieron

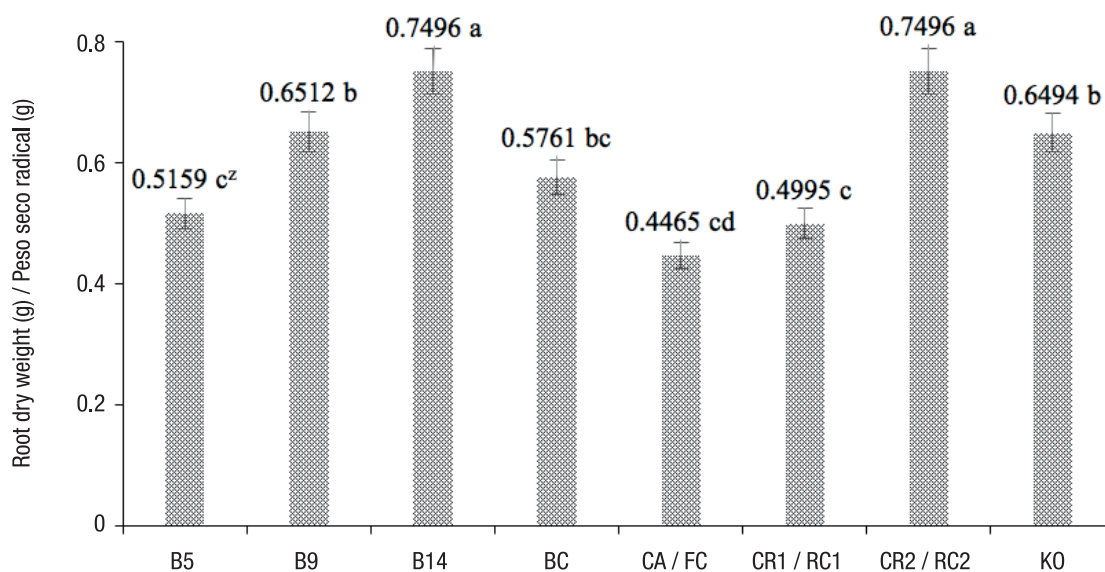


Figure 1. Effect of *Burkholderia* sp. and *Klebsiella oxitogena* on the root dry weight of maize var. Jala 40 days after sowing under greenhouse conditions (n = 20). B5 = maize inoculated with *Burkholderia* sp. 5 and urea dose at 50 %; B9 = maize inoculated with *Burkholderia* sp. 9 and urea dose at 50 %; B14 = maize inoculated with *Burkholderia* sp. 14 and urea dose at 50 %; BC = maize inoculated with *Burkholderia cepacia* ATTC 25416 and urea dose at 50 %; FC = non inoculated maize and irrigated with water; RC1 = non inoculated maize and urea dose at 50 %; RC2 = non inoculated maize and urea dose at 100 %; KO = maize inoculated with *Klebsiella oxitogena* and urea dose at 50 %. ²Means with the same letter between bars do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.01$).

Figura 1. Efecto de *Burkholderia* sp. y *Klebsiella oxitogena* sobre el peso seco radical de maíz var. Jala a los 40 días después de la siembra en invernadero (n = 20). B5 = maíz inoculado con *Burkholderia* sp. 5 y dosis de urea al 50 %; B9 = maíz inoculado con *Burkholderia* sp. 9 y dosis de urea al 50 %; B14 = maíz inoculado con *Burkholderia* sp. 14 y dosis de urea al 50 %; BC = maíz inoculado con *Burkholderia cepacia* ATTC 25416 y dosis de urea al 50 %; CA = maíz sin inocular e irrigado con agua; CR1 = maíz sin inocular y dosis de urea al 50 %; CR2 = maíz sin inocular y dosis de urea al 100 %; KO = maíz inoculado con *Klebsiella oxitogena* y dosis de urea al 50 %. ²Medias con la misma letra entre barras no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.01$).

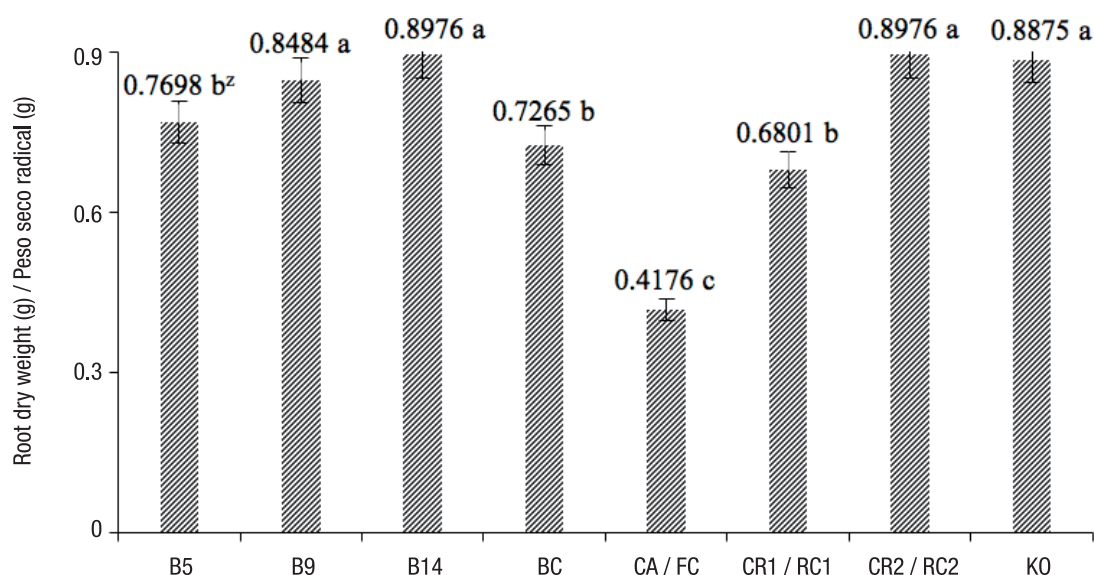


Figure 2. Effect of *Burkholderia* sp. and *Klebsiella oxitogena* on the root dry weight of maize var. Jala 40 days after sowing under soil conditions (n = 20). B5 = maize inoculated with *Burkholderia* sp. 5 and urea dose at 50 %; B9 = maize inoculated with *Burkholderia* sp. 9 and urea dose at 50 %; B14 = maize inoculated with *Burkholderia* sp. 14 and urea dose at 50 %; BC = maize inoculated with *Burkholderia cepacia* ATTC 25416 and urea dose at 50 %; FC = non inoculated maize and irrigated with water; RC1 = non inoculated maize and urea dose at 50 %; RC2 = non inoculated maize and urea dose at 100 %; KO = maize inoculated with *Klebsiella oxitogena* and urea dose at 50 %. ^zMeans with the same letter between bars do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.01$).

Figura 2. Efecto de *Burkholderia* sp. y *Klebsiella oxitogena* sobre el peso seco radical de maíz var. Jala a los 40 días después de la siembra en campo (n = 20). B5 = maíz inoculado con *Burkholderia* sp. 5 y dosis de urea al 50 %; B9 = maíz inoculado con *Burkholderia* sp. 9 y dosis de urea al 50 %; B14 = maíz inoculado con *Burkholderia* sp. 14 y dosis de urea al 50 %; BC = maíz inoculado con *Burkholderia cepacia* ATTC 25416 y dosis de urea al 50 %; CA = maíz sin inocular e irrigado con agua; CR1 = maíz sin inocular y dosis de urea al 50 %; CR2 = maíz sin inocular y dosis de urea al 100 %; KO = maíz inoculado con *Klebsiella oxitogena* y dosis de urea al 50 %. ^zMedias con la misma letra entre barras no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.01$).

interior of the maize root system (Velázquez, Ventura, Hernández, Aguilar, & Hernández, 1999), where PGPB were located and transformed certain amino acids and other organic compounds of the root metabolism into plant growth promoting substances (Thomas-Bauzon, Weinhard, Villecourt, & Balandreau, 1982). These substances induced the greatest proliferation and elongation of secondary roots, which in turn increased the area of exploration of the root system to improve mineral absorption and optimize urea dosage (Gómez-Luna et al., 2012; Noumavo, Agbodjato, Baba-Moussa, Adjanohoun, & Baba-Moussa, 2016).

Figure 3 shows the positive response of maize var. Jala to *Burkholderia* sp. 9 in terms of DWG at 180 days after planting. The treatment B9 did not differ statistically from the control RC2, whose values were 236.71 and 236.73 g, respectively, but both were statistically different from the rest of the treatments.

The positive response of maize to PGPB confirms that both *Burkholderia* sp. and *K. oxitogena* colonized the

el tiempo suficiente después de la inoculación en las semillas (Moreno-Reséndez et al., 2018), para luego reproducirse en la espermósfera de la semilla durante la germinación y, posteriormente, colonizar el interior del sistema radicular del maíz (Velázquez, Ventura, Hernández, Aguilar, & Hernández, 1999), en donde las BAPOCEVE se ubicaron y transformaron ciertos aminoácidos y otros compuestos orgánicos del metabolismo de la raíz en sustancias promotoras de crecimiento vegetal (Thomas-Bauzon, Weinhard, Villecourt, & Balandreau, 1982). Dichas sustancias indujeron la mayor proliferación y elongación de raíces secundarias, que a su vez aumentaron el área de exploración del sistema radicular para mejorar la absorción mineral y optimizar la dosis de urea (Gómez-Luna et al., 2012; Noumavo, Agbodjato, Baba-Moussa, Adjanohoun, & Baba-Moussa, 2016).

La Figura 3 muestra la respuesta positiva del maíz var. Jala a *Burkholderia* sp. 9 en cuanto al PSG a los 180 días después de la siembra. El tratamiento B9 no difirió estadísticamente del testigo CR2, cuyos valores

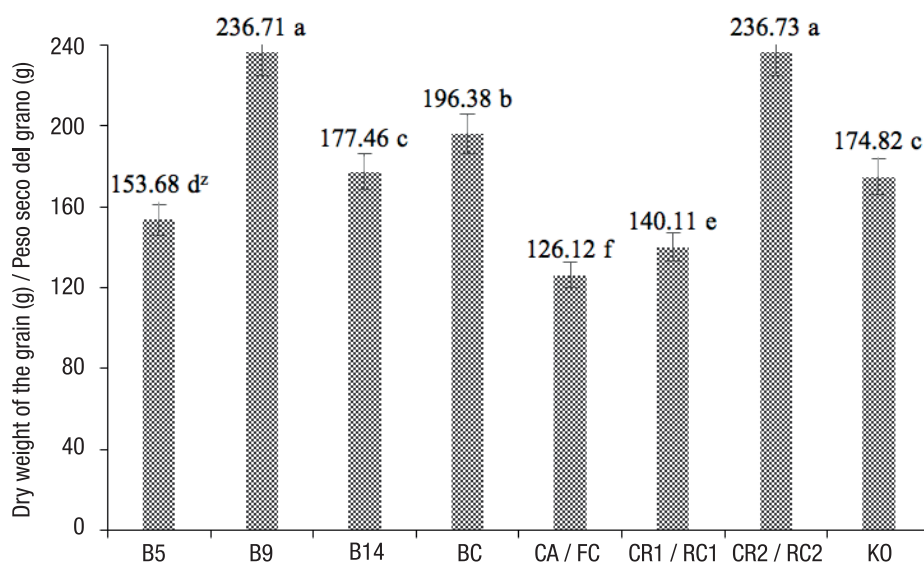


Figure 3. Effect of *Burkholderia* sp. and *Klebsiella oxitogena* on the root dry weight of maize var. Jala 180 days after sowing under soil conditions (n = 20). B5 = maize inoculated with *Burkholderia* sp. 5 and urea dose at 50 %; B9 = maize inoculated with *Burkholderia* sp. 9 and urea dose at 50 %; B14 = maize inoculated with *Burkholderia* sp. 14 and urea dose at 50 %; BC = maize inoculated with *Burkholderia cepacia* ATTC 25416 and urea dose at 50 %; FC = non inoculated maize and irrigated with water; RC1 = non inoculated maize and urea dose at 50 %; RC2 = non inoculated maize and urea dose at 100 %; KO = maize inoculated with *Klebsiella oxitogena* and urea dose at 50 %. ^zMeans with the same letter between bars do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.01$).

Figura 3. Efecto de *Burkholderia* sp. y *Klebsiella oxitogena* sobre el peso seco radical de maíz var. Jala a los 180 días después de la siembra en campo (n = 20). B5 = maíz inoculado con *Burkholderia* sp. 5 y dosis de urea al 50 %; B9 = maíz inoculado con *Burkholderia* sp. 9 y dosis de urea al 50 %; B14 = maíz inoculado con *Burkholderia* sp. 14 y dosis de urea al 50 %; BC = maíz inoculado con *Burkholderia cepacia* ATTC 25416 y dosis de urea al 50 %; CA = maíz sin inocular e irrigado con agua; CR1 = maíz sin inocular y dosis de urea al 50 %; CR2 = maíz sin inocular y dosis de urea al 100 %; KO = maíz inoculado con *Klebsiella oxitogena* y dosis de urea al 50 %. ^zMedias con la misma letra entre barras no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.01$).

interior of the root system, where they transformed some amino acids derived from the heterotrophic metabolism of the roots into auxins (Ahemad & Kibret, 2014), which increased the capacity of the root exploration area, as well as the mineral absorption and the optimization of the reduced urea dose (Bevivino, Dalmastrri, Tabacchioni, & Chiarini, 2000; Carcaño-Montiel et al., 2006; Parray et al., 2016). The above indicates that both bacteria, by being located inside the root system, avoided external competition from the PGPB in the rhizosphere (Ahemad & Kibret, 2014), which limits the optimization of the NIFE in maize. In addition, the specificity that exists between the genera and species of PGPB of the teocintle and the organs of maize var. Jala also contributed, given the close genetic relationship between both gramineous, because although var. Jala is a domestic plant, it has conserved genes that allowed it to interact positively with the PGPB endophytes of the teocintle (Castellanos-Morales et al., 2005; Eubanks, 2001; Hernández et al., 2015).

fueron 236.71 y 236.73 g, respectivamente, pero ambos fueron estadísticamente diferentes al resto de los tratamientos.

La respuesta positiva del maíz a las BAPOCEVE confirma que tanto *Burkholderia* sp. como *K. oxitogena* colonizaron el interior del sistema radical, sitio donde transformaron algunos aminoácidos derivados del metabolismos heterótrofo de las raíces en auxinas (Ahemad & Kibret, 2014), las cuales aumentaron la capacidad del área de exploración de las raíces, así como la absorción mineral y la optimización de la dosis de urea reducida (Bevivino, Dalmastrri, Tabacchioni, & Chiarini, 2000; Carcaño-Montiel et al., 2006; Parray et al., 2016). Lo anterior indica que ambas bacterias, al ubicarse en el interior del sistema radical, evitaron la competencia externa de las BAPOCEVE de la rizósfera (Ahemad & Kibret, 2014), la cual limita la optimización del FENI en maíz. Además, también contribuyó la especificidad que existe entre los géneros y especies de BAPOCEVE del teocintle y los órganos del maíz var. Jala dada la estrecha

Conclusions

The maize var. Mexicana (teocintle) is a potential source of plant growth promoting bacteria such as *Burkholderia* sp. and *Klebsiella oxytoga*, which converted organic exudates from the root of maize var. Jala into plant growth promoting substances, for improvement, optimization of the urea dose at 50 % and healthy growth; furthermore, this avoids the rapid loss of soil fertility.

Acknowledgements

The authors thank the project 2.7 of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo-BIONUTRA S.A. de C.V. The authors also thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México)- the National Center for Scientific Research (France) for the project E130-132/98. To Dr. Jacques Balandreau and Tran Van Van from Claude Bernard Lyon 1 University and to the Laboratory of Microbial Soil Ecology. To MVZ Farias from the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo for the facilities granted for the field experiment and to Beatriz Noriega Gamboa for the office work.

End of English version

References / Referencias

- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King saud University-science*, 26(1), 1-20. doi: 10.1016/j.jksus.2013.05.001
- Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology advances*, 16(4), 729-770. doi: 10.1016/S0734-9750(98)00003-2
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., & Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science*, 17(8), 478-486. doi: 10.1016/j.tplants.2012.04.001
- Bevivino, A., Dalmastrì, C., Tabacchioni, S., & Chiarini, L. (2000). Efficacy of *Burkholderia cepacia* MCI 7 in disease suppression and growth promotion of maize. *Biology and Fertility of Soils*, 31(3-4), 225-231. doi: 10.1007/s003740050649
- Carcaño-Montiel, M. G., Ferrera-Cerrato, R., Pérez-Moreno, J., Molina-Galán, J. D., & Bashan, Y. (2006). Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. *Terra Latinoamericana*, 24(4), 493-502. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57324407>
- Cárdenas-Navarro, R., Sánchez-Yáñez, J. M., Fariás-Rodríguez, R., & Peña-Cabriales, J. J. (2004). Los aportes de nitrógeno en la agricultura. *Revista Chapingo*

relación genética entre ambas gramíneas, pues aunque la var. Jala es una planta doméstica ha conservado genes que le permitieron interactuar positivamente con las BAPOCEVE endófitas del teocintle (Castellanos-Morales et al., 2005; Eubanks, 2001; Hernández et al., 2015).

Conclusiones

El maíz var. Mexicana (teocintle) es una fuente potencial de bacterias promotoras de crecimiento vegetal como *Burkholderia* sp. y *Klebsiella oxytoga*, las cuales convirtieron exudados orgánicos de la raíz del maíz var. Jala en sustancias promotoras de crecimiento vegetal, para la mejora, la optimización de la dosis urea al 50 % y un sano crecimiento; además, esto evita la rápida pérdida de fertilidad del suelo.

Agradecimientos

Al proyecto 2.7 de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo-BIONUTRA S.A. de C.V. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México)- Centro Nacional para la Investigación Científica (Francia) por el proyecto E130-132/98. A los doctores Jacques Balandreau y Tran Van Van de la Universidad Claude Bernard Lyon 1 y al Laboratorio de Ecología Microbiana del Suelo, Lyon, Francia. Al MVZ Fariás de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por las facilidades otorgadas para el experimento de campo y a Beatriz Noriega Gamboa por el trabajo secretarial.

Fin de la versión en español

- Serie Horticultura*, 10(2), 173-178. doi: 10.5154/r.rchsh-2002.07.039
- Castellanos-Morales, V. C., Villegas, J., Cárdenas-Navarro, R., Fariás-Rodríguez, R., & Sánchez-Yáñez, J. M. (2005). Diversity of *Burkholderia cepacia* associated to teocinte. *Phyton*, 54, 27-38. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/236001544_Diversity_of_Burkholderia_cepacia_associated_to_teocinte
- Eubanks, M. W. (2001). The mysterious origin of maize. *Economic Botany*, 55(4), 492-514. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/4256485>
- Galinat, W. C. (2001). Notes on economic plants. *Economic Botany*, 55(4), 570-574. doi: 10.1007/BF02871719
- García-González, M. M., Fariás-Rodríguez, R., Peña-Cabriales, J. J., & Sánchez-Yáñez, J. M. (2005). Inoculación del trigo var. Pavón con *Azospirillum* spp. y *Azotobacter beijerinckii*. *Terra Latinoamericana*, 23(1), 65-72. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57323109>
- Gómez-Luna, B. E., Hernández-Morales, A., Herrera-Méndez, C. H., Arroyo-Figueroa, G., Vargas-Rodríguez, L., &

- Olalde-Portugal, V. (2012). Aislamiento de bacterias promotoras del crecimiento de la rizósfera de plantas de guayaba (*Psidium guajava*). *Ra Ximhai*, 8(3), 97-102. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46125176008>
- Guerrero, G. A. (1990). *El suelo, los abonos y la fertilización de los cultivos*. Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Gutiérrez-Mañero, F. J., Ramos-Solano, B., Mehouchi, J., Tadeo, F. R., & Talon, M. (2001). The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*, 111(2), 206-211. doi: 10.1034/j.1399-3054.2001.1110211.x
- Hernández, F., Velásquez, K., Carreño, C., Lloclla, H., Estela, C., & Altamirano, C. (2015). Efecto de enterobacterias en el desarrollo vegetativo de *Zea mays* en invernadero. *UCV-HACER. Revista de Investigación y Cultura*, 4(1), 10-19. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/5217/521751973001.pdf>
- Holt, J. G. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. USA: Williams & Wilkins.
- Kurek, E., & Jaroszuk-Ściseł, J. (2003). Rye (*Secale cereale*) growth promotion by *Pseudomonas fluorescens* strains and their interactions with *Fusarium culmorum* under various soil conditions. *Biological Control*, 26(1), 48-56. doi:10.1016/S1049-9644(02)00115-9
- Loredo-Osti, C., López-Reyes, L., & Espinosa-Victoria, D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*, 22(2), 225-239. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57322211>
- Martínez-Viveros, O., Jorquera, M. A., Crowley, D. E., Gajardo, G., & Mora, M. L. (2010). Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of soil science and plant nutrition*, 10(3), 293-319. doi: 10.4067/S0718-95162010000100006
- Massena-Reis, V., Ivo-Baldani, J., Divan-Baldani, V. L., & Dobereiner, J. (2000). Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. *Critical Reviews in Plant Science*, 19(3), 227-247. doi: 10.1080/07352680091139213
- Moreno-Reséndez, A., García-Mendoza, V., Reyes-Carrillo, J. L., Vásquez-Arroyo, J., & Cano-Ríos, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 68-83. doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707
- Noumavo, P. A., Agbodjato, N. A., Baba-Moussa, F., Adjanohoun, A., & Baba-Moussa, L. (2016). Plant growth promoting rhizobacteria: Beneficial effects for healthy and sustainable agriculture. *African Journal of Biotechnology*, 15(27), 1452-1463. doi: 10.5897/AJB2016.15397
- Parray, J. A., Jan, S., Kamili, A. N., Qadri, R. A., Egamberdieva, D., & Ahmad, P. (2016). Current perspectives on plant growth-promoting rhizobacteria. *Journal of Plant growth regulation*, 35(3), 877-902. doi: 10.1007/s00344-016-9583-4
- Pedraza, R. O., Teixeira, K. R., Fernández-Scavino, A., García-de Salamone, I., Baca, B., Azcón, R., Baldani, V. L., & Bonilla, R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 11(2), 155-164. doi: 10.21930/rcta.vol11_num2_art:206
- Riggs, P. J., Chelius, M. K., Iniguez, A. L., Kaeppler, S. M., & Triplett, E. W. (2001). Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Functional Plant Biology*, 28(9), 829-836. doi: 10.1071/PP01045
- Sánchez-Yáñez, J. M. (2007). *Breve tratado de microbiología agrícola, teórica y práctica*. México: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Thomas-Bauzon, D., Weinhard, P., Villecourt, P., & Balandreau, J. (1982). The spermosphere model. I. Its use in growing, counting, and isolating N₂-fixing bacteria from the rhizosphere of rice. *Canadian Journal of Microbiology*, 28(8), 922-928. doi: 10.1139/m82-139
- Valdivia-Uridales, B., Fernández-Brondo, J. M., & Sánchez-Yáñez, J. M. (1999). Efecto de la inoculación con de *Glomus* spp. y *Pseudomonas putida* en trigo. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 41, 231-237. Retrieved from <https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-1999/mi994f.pdf>
- Vallejo-Delgado, H. L., Ramírez-Díaz, J. L., Chuela-Bonaparte, M., & González-Íñiguez, R. M. (2004). *Tecnología para producir Maíz en el Bajío Michoacano*. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Retrieved from http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1267/maiz_bajio_1267.pdf?sequence=1
- Velázquez, M., Ventura, E., Hernández, A., Aguilar, S., & Hernández, A. N. (1999). Estudio de la interacción maíz-*Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia*. *Revista Latinoamericana de Microbiología-Mexico*, 41(1), 17-24. Retrieved from <https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-1999/mi991d.pdf>