

EFFECTO DE *ARTHROBACTER AGILIS* UMCV2 SOBRE LA GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE *PINUS DEVONIANA* LINDLEY

EFFECT OF *ARTHROBACTER AGILIS* UMCV2 ON GERMINATION AND GROWTH OF *PINUS DEVONIANA* LINDLEY

**Wilber Montejó-Mayo¹, Eduardo Valencia-Cantero²,
Pablo López-Albarrán¹ y Crisanto Velázquez-Becerra¹**

¹Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio D, Ciudad Universitaria. CP 58030, Morelia, Michoacán, México. Tel: 5.443.3223500 Ext. 3099; Fax: 5.443.3260379.

²Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio B5; Ciudad Universitaria. CP 58030, Morelia, Michoacán, México.

Correo electrónico: cvelazquez@umich.mx

RESUMEN

Los microorganismos del suelo son indispensables para el crecimiento, emergencia y desarrollo de prácticamente todas las plantas. En nuestro trabajo decidimos evaluar el efecto que ejerce la rizobacteria *A. agilis* UMCV2 sobre la germinación y el crecimiento de plantas de interés económico-forestal como *P. devoniana* hasta una edad de 65 días. Nuestros resultados muestran que la bacteria UMCV2 promovió el crecimiento de *P. devoniana* en esta primera etapa de desarrollo, resaltando además que a pesar del corto tiempo de interacción entre estos dos, la bacteria fue capaz de incrementar el índice de germinación, aumentar la talla de la parte aérea y de generar una proliferación de raíces laterales. Los datos señalan un enorme potencial para usar inóculos tanto en condiciones de invernadero como en suelo abierto y generar una promoción del crecimiento en especies de interés tanto agrícola como

forestal, de esa manera reducir los periodos de producción en función del cultivo.

Palabras clave: germinación, *Arthrobacter agilis* UMCV2 y *Pinus devoniana*.

ABSTRACT

Soil microorganisms are essential for growth, emergence and development in all plants. In our study we decided to evaluate the effect that *A. agilis* UMCV2 rhizobacteria had on germination and growth of plants of economic-forest interest as *P. devoniana* to an age of 65 days. Our results show that the UMCV2 bacteria promoted growth of *P. devoniana* at this early stage of development, further highlighting that despite the short time of interaction between these two, the bacterium was able to increase the rate of germination, increase the size of shoot and generate a proliferation of lateral roots. The data shows a huge potential for using inoculum both in the greenhouse and in

open ground and generate a growth promoting species of interest in both agricultural and forest, thereby reducing production periods depending on the crop.

Key words: germination, *Arthrobacter agilis* UMCV2 and *Pinus devoniana*.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el género *Pinus* está constituido por más de un centenar de especies, es el género de coníferas más extenso del hemisferio norte incluyendo México (Eckert y Hall, 2006), el 85% de los recursos maderables proviene de este grupo de especies forestales (SEMARNAT, 2010; Caballero, 2010). En nuestro país estas especies se destacan por su amplia distribución e importancia económica, por ejemplo; *Pinus devoniana* Lindley también conocida como *Pinus michoacana* Martínez o *Pinus michoacaensis* Roezl (Perry *et al.*, 2000) es endémica de México y Guatemala, en México está distribuida en los estados de Nayarit, Jalisco, Colima Michoacán, Guerrero, Guanajuato, Morelos, Puebla, Hidalgo, Tlaxcala, Oaxaca, Veracruz, Zacatecas y Chiapas (CONAFOR, 2012). La madera de *P. devoniana* se destina principalmente a la industria de la celulosa y el aserrío, obteniéndose de ellos diferentes productos de un alto valor económico (Perry *et al.*, 2000; Flores-Velázquez *et al.*, 2007). Sin embargo, *P. devoniana* requiere de un largo periodo de tiempo para poder ser aprovechada, ya que tarda al menos 10 años en alcanzar la talla necesaria para su explotación comercial (Zepeda y Acosta, 2000).

Una de las alternativas para mejorar y conservar estos recursos forestales la componen la realización de investigaciones sobre la

biología y los métodos para el manejo de semillas (Meraz *et al.*, 1999). En ocasiones las semillas viables inhiben su germinación, posiblemente debido a no existir condiciones propicias, como por ejemplo el pH, temperatura o disponibilidad de nutrientes (Miransari y Smith, 2014). La mayoría de las investigaciones que se han llevado a cabo como los tratamientos pregerminativos se realizan particularmente para optimizar los tiempos de germinación y obtener un mayor porcentaje de semillas germinadas (Martínez-Pérez *et al.*, 2006).

Las pruebas de germinación se han realizado en condiciones de temperatura, sustrato, pH y luz, las cuales han mostrado que existe un efecto diferencial dependiente de cada uno de estos factores (Samaniego, 1995; Sánchez *et al.*, 2006; Reino *et al.*, 2008). Un estudio enfocado en cuatro especies arbóreas forrajeras (*Guazuma ulmifolia*, *Enterolobium cyclocarpum*, *Pithecellobium dulce* y *Prosopis laevigata*) mediante el uso de escarificación e inmersión en ácido sulfúrico mostró un aumento del porcentaje de germinación (Hernández-Vargas *et al.*, 2001). Por otro lado, los microorganismos del suelo son indispensables en ecosistemas forestales (Baldrian *et al.*, 2012), podemos encontrar principalmente hongos y bacterias, cuyo efecto puede ser la estimulación tanto en la germinación como en el crecimiento vegetal. La inoculación con estos organismos fúngicos o bacterianos promotores del crecimiento vegetal (Plant Growth Promoting Rhizobacteria o PGPRs) (Lugtenberg y Kamilova, 2009) constituyen una importante herramienta biotecnológica, fortaleciendo, entre otras cosas, su adaptación al campo y aumentando las posibilidades de sobrevivencia (Lucy *et al.*, 2004; Bais *et al.*, 2006).

Las PGPRs pueden promocionar del crecimiento vegetal de diversas formas, por ejemplo: *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* pueden formar nódulos en leguminosas (Ferreira *et al.*, 2012), existen microorganismos solubilizadores hierro y fosfatos (Bhattacharyya y Jha, 2012), otros producen aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa (ACC) (Glick *et al.*, 2007), también pueden interferir con los mecanismos de comunicación quórum-sensing (QS), producen fitohormonas, inhiben la actividad antifúngica y producen compuestos orgánicos volátiles (VOC) (Nelson, 2004; Hass y Défago, 2005; Hallmann y Berg, 2006). En especies forestales como *Pinus sylvestris* y *Pinus radiata* presentan simbiontes naturales como micorrizas y bacterias (Timonen y Hurek, 2006). *P. sylvestris* presenta principalmente en su comunidad simbiontes bacterianos del género *Burkholderia* y especies del género *Paenibacillus*. Algunas de estas bacterias puede ayudar a los árboles con la adquisición de nitrógeno, ya que sus propiedades diazotróficas albergan nitrógeno reductasa (Timonen y Hurek, 2006). En cambio, *P. radiata* presenta organismos como *Beta-proteobacteria*, *Bacilli*, *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Sphingobacteria*, *Gammaproteobacteria* y *Acidobacteria*, generando ventajas en cuanto la fijación de nitrógeno y la oxidación de amonio, así como en el crecimiento de la planta y el control biológico de organismos patógenos (Lottmann *et al.*, 2010). La aplicación de este tipo de rizobacterias en diversos cultivos de numerosas etapas del desarrollo ha dado como resultado la promoción evidente del crecimiento de plantas, observándose un incremento en la emergencia, vigor, biomasa y desarrollo del sistema radical (Kamilova *et al.*, 2006; Angulo *et al.*, 2014).

Arthrobacter agilis UMCV2 es una rizo-bacteria PGPR aislada de la rizosfera de maíz, que presenta características de solubilizar hierro (Valencia-Cantero *et al.*, 2007). Esta cepa ha demostrado aumentar el estatus nutrimental en *Phaseolus vulgaris* L., generando un marcado aumento en la biomasa (peso fresco de la planta). *A. agilis* UMCV2 también ha mostrado promover el crecimiento de *Medicago sativa*, como la longitud de la parte aérea, densidad de raíces laterales y peso fresco. Por medio de un análisis cromatográfico se identificó que esta cepa produce un aminolípido denominado dimetilhexadecilamina, implicado en el aumento del crecimiento vegetal en estas especies de interés agrícola (Velázquez-Becerra *et al.*, 2011). Sin embargo, estudios enfocados a conocer el efecto que produce *A. agilis* en especies forestales desde sus primeras etapas de desarrollo no existen. Por esta razón, decidimos evaluar la germinación y crecimiento en *P. devoniana*, mediante la inoculación con *A. agilis* UMCV2, colaborando con información valiosa para a mediano plazo obtener una herramienta biotecnológica y poder conseguir árboles maderablemente maduros en un periodo considerablemente más corto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron semillas de *Pinus devoniana*, las cuales se obtuvieron de la Comisión Forestal del Estado de Michoacán (COFOM), México.

Cepa bacteriana

Se usó la cepa *Arthrobacter agilis* UMCV2 (Valencia-Cantero *et al.*, 2007), propor-

cionada por el Laboratorio de Ecología Microbiana del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH, Morelia Michoacán, México.

Preparación del inóculo bacteriano

La rizobacteria *A. agilis* UMCV2 se crece previamente en cajas de Petri con aproximadamente 30 ml de agar nutritivo (AN), el organismo se deja por un periodo de cinco días en la oscuridad a 26°C, una vez que ha alcanzado el umbral de crecimiento en las cajas de Petri posteriormente se recuperaran las células con 10 ml de agua desionizada estéril, hasta conseguir un volumen final de 250 ml a una absorbencia de 1,0 con una longitud de onda de 600 nm (Catford *et al.*, 2003). Este último volumen obtenido se resuspende con agua corriente estéril para aforar a 300 ml y utiliza aplicándolo como agua de riego para cada maceta (solución UMCV2).

Efecto de *A. agilis* UMCV2 sobre la germinación de *P. devoniana* L.

Se usaron semillas de *P. devoniana* las cuales se esterilizaron superficialmente mediante un lavado en hipoclorito de sodio (Cloralex^{M.R.}) al 10% durante diez minutos, a continuación se enjuagan en agua corriente estéril cinco veces. Posteriormente, se tomaron la mitad de las semillas y se sumergieron por 12 horas en la solución UMCV2 ya descrita con anterioridad (9×10^8 cel mL⁻¹). Las semillas se germinaron en cajas de Petri estériles con papel filtro humedecido con 10 ml de agua corriente también estéril, para después ser colocadas en una cámara de crecimiento con luz y temperatura controladas, durante un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad, a una intensidad de luz de 200 mmolm⁻²s⁻¹ a 22-

23°C. Cuando la primera semilla germinó, es decir: apareció visiblemente la radícula (Lovey *et al.*, 2010), se dejaron por nueve días más para poder evaluar los parámetros de respuesta como la longitud total de la plántula, peso fresco total de la plántula y el porcentaje de germinación.

Efecto de *A. agilis* UMCV2 sobre el crecimiento en plántulas de *P. devoniana* L.

Las plántulas utilizadas en el experimento anterior se trasladaron cuidadosamente con ayuda de una pinza de disección a tubetes de plástico. El sustrato que se empleó en este experimento fue de acuerdo a una modificación de los utilizados por Morales 2014 y Montejo 2015, donde se mezclaron los siguientes elementos: 1 kg de peatmoss (60%), agrolita (20%) y vermiculita (20%), respectivamente, con un pH 5.45 previamente esterilizado en autoclave para después dividirse en dos tratamientos: el primero es un tratamiento llamado “control” (sin inóculo), donde se colocaron las plántulas durante un periodo de 65 días; el segundo se trata de un tratamiento experimental llamado “*A. agilis* UMCV2”, donde se colocaron las plántulas y se reinocularon con la cepa UMCV2 también hasta cumplir 65 días de edad después de la germinación. Este segundo experimento se llevó a cabo en el invernadero del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH bajo condiciones no controladas de luz ni temperatura (Zurita-Valencia *et al.*, 2014). Durante este periodo los tubetes que contenían las plántulas fueron regados cada tres días con 300 ml de agua corriente estéril. Al terminar el experimento se evaluaron los siguientes índices de respuesta en plántulas: longitud total de la plántula, longitud de la parte aérea, peso fresco total de la plántula

y densidad de raíces laterales (Velázquez-Becerra *et al.*, 2011).

Análisis estadístico

El experimento se realizó dos veces de manera independiente, se usó el paquete estadístico STATISTICA 7.0 de statsoft, aplicando una ANOVA (significancia de 0.05), n = 30 individuos por tratamiento.

RESULTADOS

Efecto de *A. agilis* UMCV2 en semillas de *P. devoniana*

Nuestros resultados muestran que las semillas de *P. devoniana* al ser germinadas en presencia de la bacteria *A. agilis* UMCV2 después de nueve días obtuvimos plántulas de mayor longitud. En la figura 1A se aprecian el efecto al ser germinadas en condiciones de esterilidad, mostrando valores de 1.4 cm de longitud en el tratamiento control, contra 2.7 cm para el tratamiento previamente inoculado con la bacteria, siendo estadísticamente significativo el aumento de talla. Sin embargo, en la figura 1B mostramos que en el peso fresco de las plántulas no hubo un aumento estadísticamente significativo entre tratamientos después de nueve días de exposición al inóculo.

También en nuestros resultados encontramos que el porcentaje de germinación entre los tratamientos control y *A. agilis* UMCV2, mostró un aumento del 10% en semillas previamente inoculadas. En la figura 1C vemos los valores de 76% para el control contra 86% para UMCV2.

Efecto de *A. agilis* UMCV2 en plántulas de *P. devoniana*

Para nuestro siguiente experimento, en donde las plántulas se colocaron en tubetes con sustrato estéril por un periodo de 65 días, los datos muestran que la longitud total de la plántula no presenta diferencias significativas. En la figura 2A vemos los valores del tratamiento control con 14.5 cm y 15.5 cm para el inoculado con UMCV2. Sin embargo, con los datos de la longitud de la parte área de la plántula descubrimos una clara diferencia estadísticamente significativa (fig. 2B), con valores de 5.2 cm (control) contra 8.5 cm (*A. agilis* UMCV2). En el peso fresco total de las plántulas no encontramos diferencias significativas entre tratamientos después de 65 días, pero sí observamos una clara tendencia a un mayor peso en los tratamientos inoculados con la bacteria (fig. 2C).

Un aspecto importante durante el desarrollo vegetal se lleva a cabo en la raíz de las plántulas, nuestros datos indican un efecto diferencial sobre la densidad de las raíces laterales. En la figura 2D tenemos que la presencia de la bacteria UMCV2, tras 65 días del experimento, fue capaz de promover de manera estadísticamente significativa una mayor densidad de raíces laterales, mostrando valores de 2.4 contra 5.1 raíces laterales por cm². En la figura 3 podemos ver plántulas representativas del experimento para los dos tratamientos, en donde percibimos las condiciones generales de talla y morfología radicular.

DISCUSIÓN

Con los resultados obtenidos podemos ver como la presencia de la rizobacteria *A.*

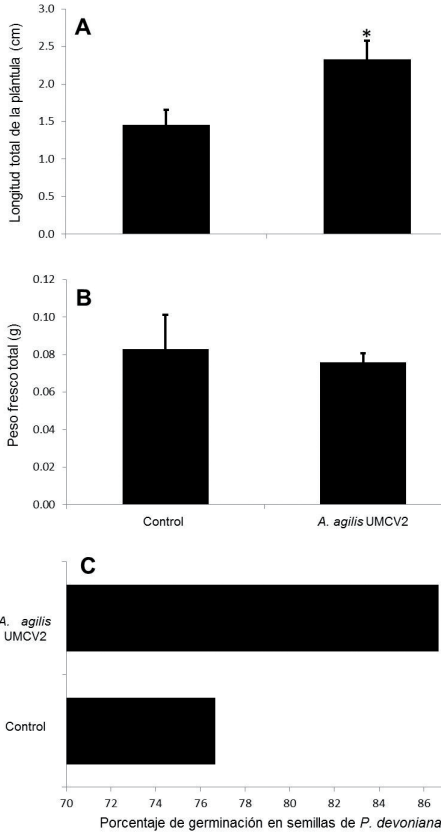


Fig. 1. Efecto de *A. agilis* UMCV2 en semillas de *P. devoniana* a nueve días después de su germinación. El panel A muestra la longitud total de la plántula, el panel B muestra el peso fresco total de la plántula y el panel C indica el porcentaje de germinación. El asterisco señala si hay diferencia significativa entre tratamientos, sólo para el panel A y B, ANOVA ($p < 0.05$).

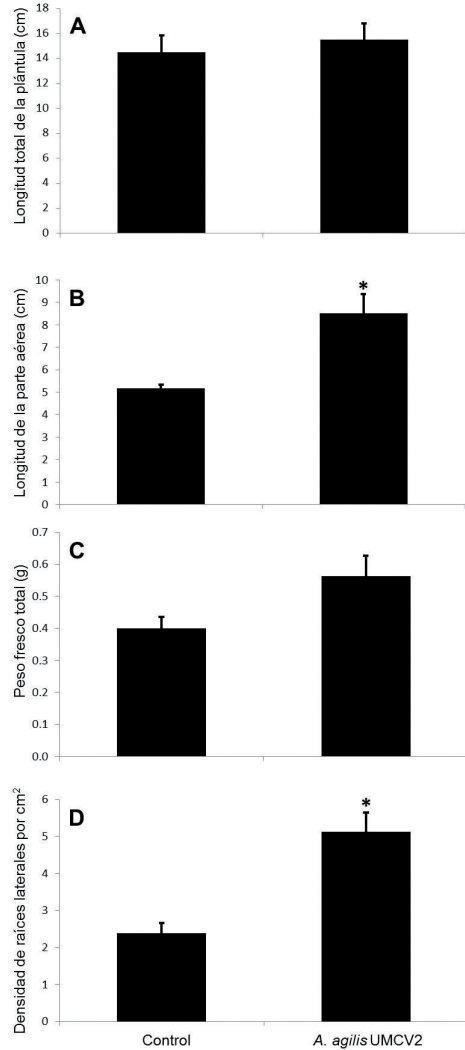


Fig. 2. Efecto de *A. agilis* UMCV2 en plántulas de *P. devoniana* a 65 días de edad. El panel A muestra la longitud total de la plántula, el panel B muestra la longitud de la parte aérea, el panel C muestra el peso fresco total de la plántula y el panel D indica la densidad de raíces laterales. El asterisco señala si hay diferencia significativa entre tratamientos, ANOVA ($p < 0.05$).

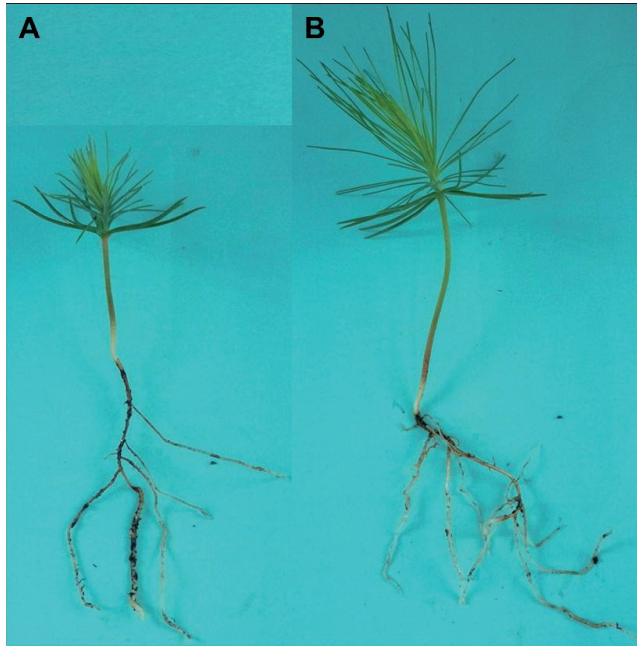


Fig. 3. Efecto de *A. agilis* UMCV2 en plántulas de *P. devoniana*, imágenes representativas del experimento después de 65 días de edad. En el panel A se muestra a *P. devoniana* crecida en condiciones de esterilidad (control) y el panel B se muestra a *P. devoniana* inoculada con *A. agilis* UMCV2. En ellas se puede ver una mayor talla y densidad de raíces laterales en plántulas crecidas en presencia de la bacteria.

agilis UMCV2 influyó en la germinación y crecimiento de *P. devoniana*. En nuestro experimento de germinación, después de nueve días se desarrollaron plántulas de mayor longitud. Sin embargo, bajo estas condiciones después de 65 días el crecimiento no fue significativamente superior, ya que la longitud total de la plántula no muestra una diferencia estadística entre estos dos tratamientos (fig. 2A). Por otro lado, cuando analizamos el crecimiento alcanzado por la parte aérea de la plántula encontramos que los tratamientos inoculados con la bacteria UMCV2 mostraron

un mayor crecimiento que el tratamiento control a 65 días de edad.

En el proceso de germinación están implicados mecanismos morfológicos y fisiológicos que resultan en la activación del embrión, los factores que intervienen en este fenómeno son principalmente el agua, algunas proteínas y hormonas vegetales. El balance entre el ABA y las giberelinas son determinantes en la germinación, como lo son los compuestos nitrogenados, estos últimos pueden provocar la germinación mediante un ajuste en las concentraciones de K^+/Na^+ , además

de un incremento en la producción de ATP (Miransari y Smith, 2014). Sabemos que la cepa UMCV2 secreta metabolitos ricos en N, como por ejemplo la dimetil pirazina, metil triazol y dimetilhexadecilamina (Velázquez-Becerra *et al.*, 2011) que pudieran estar involucrados de forma directa.

Los datos obtenidos en el peso fresco de las plántulas mostraron que a nueve y 65 días después de la inoculación no se produjo un aumento estadísticamente significativo. Sin embargo, a los 65 días podemos apreciar una marcada tendencia al aumento de peso (fig. 2C). La presencia de bacterias del género *Arthrobacter* en interacción con pináceas ya se ha reportado con anterioridad (Pokojska, 1982), en donde el autor describe en su trabajo un incremento del 69% en la longitud del tallo; *Arthrobacter oxydans* reporta un incremento de la altura y biomasa de un 68% en árboles de *Pseudotsuga menziesii* (Chanway y Holl, 1994); *Arthrobacter citreus* genera un aumento en la biomasa en arboles de *Picea mariana* (Lucy *et al.*, 2004).

El uso de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal es una práctica usual en la industria forestal, la agricultura y la restauración ecológica (Lucy *et al.*, 2004; Frey *et al.*, 2007). Bacterias de estas características presentan la cualidad de promover el crecimiento vegetal por varias vías, en la que se encuentra la inhibición de patógenos, solubilización de minerales o producción de reguladores del crecimiento vegetal (Okon *et al.*, 1998; Bloemberg y Lugtenberg, 2001; Lucy *et al.*, 2004). En el suelo se pueden tener microorganismos tanto bacterias como hongos que aumentan el rendimiento de la planta; encontramos organismos como *Agrobacterium radiobacter*, *Pseudomonas fluorescens*, *Arthrobacter oxydans*, *Azospiri-*

rillum brasilense, *Bacillus megaterium*, *Stenotrophomonas maltophilia*, entre muchos otros (Leyval y Berthelin, 1989; Chanway y Holl, 1994; Mohammad y Prasad, 1998; Valencia-Cantero *et al.*, 2007).

Para el caso de la rizobacteria *A. agilis* UMCV2 sabemos que presenta la característica de promover el crecimiento vegetal mediante la emisión de compuestos orgánicos volátiles. Por lo cual creemos que compuestos como la dimetilhexadecilamina pudieran estar involucrados no sólo en la germinación, sino también en la promoción del crecimiento en plántulas. Ejemplo de ello es que sabemos existen compuestos de similar naturaleza química a las aminas y en particular la dimetilhexadecilamina, tenemos evidencia clara del papel que ejercen en el desarrollo de plantas, tal es el caso de las alcanidas. Las alcanidas son metabolitos secundarios en las plantas y originados mediante la condensación de un ácido graso insaturado y una amina (Ramírez-Chávez *et al.*, 2004). La afinina y la amidinina son alcanidas implicadas en la diferenciación y crecimiento de las plantas, además se ha visto que la afinina incrementa en un 70% la formación de primordios de raíces laterales en *Arabidopsis*, sugiriendo que la afinina puede promover la ramificación de la raíz por la inducción de raíces laterales. Además de las alcanidas, las N-acil-etanolamidas (NAEs) son cannabinoides endógenos de mamíferos y relacionados estructuralmente con las alcanidas. Los efectos mencionados por este grupo de moléculas se sabe que son capaces de propiciar un efecto de promoción para la planta similar a los encontrados en nuestro trabajo. Evidencia de lo antes mencionado, tenemos que después de 65 días de estar en contacto con la cepa UMCV2, las plántulas de *P. devoniana*

desarrollaron una mayor densidad de raíces laterales estadísticamente superior al tratamiento sin inóculo (fig. 2D).

Autores como Ryuy *et al.* (2003) mencionan que el descubrimiento de estos compuestos constituye un importante mecanismo de licitación para el crecimiento de plantas por rizobacterias. Se ha establecido bien que los volátiles producidos por las rizobacterias pueden actuar como moléculas señalizadoras que median las interacciones planta-microbio, en situaciones donde las PGPRs colonizan la raíz de la planta, para generar una respuesta positiva de crecimiento (Ping y Boland, 2004; Bhattacharyya y Jha, 2012). Sin embargo, el papel que juegan estas moléculas tanto en plantas como en microorganismos del suelo se encuentra aún en investigación (Farmer, 2001; Zhang *et al.*, 2007).

La importancia de este trabajo resalta en varios aspectos, ya que es el primero en donde se muestra el efecto de la inoculación de la rizobacteria *A. agilis* UMCV2 en semillas y plántulas de interés forestal, además se está descubriendo una novedosa interacción entre *P. devoniana*-*A. agilis* UMCV2.

CONCLUSIONES

En este trabajo encontramos que una exposición de la rizobacteria *A. agilis* UMCV2 promovió tanto la germinación como el crecimiento en plántulas de *P. devoniana* a 65 días de estudio. Los resultados señalan un potencial para usar inóculos microbianos tanto en condiciones de invernadero como en suelo abierto para generar una promoción del crecimiento en especies de interés tanto agrícola como forestal, de esa manera reducir los periodos de producción en función del cultivo.

LITERATURA CITADA

- Angulo, V.C.; E.A. Sanfuentesa, F. Rodríguez, y K.E. Sossa, 2014. "Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*". *Rev Argent Microbiol*, **46**: 338-347.
- Bais, H.P.; L.W. Tiffany, L.G. Perry, G. Simon, y J.M. Vivanco, 2006. "The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms". *Annu. Rev. Plant Biol.*, **57**: 233-266.
- Baldrian, P.; M. Kolařík, M. Štursová, J. Kopecný, V. Valášková, T. Větrovský, L. Žifčáková, J. Šnajdr, J. Rídl, Č. Vlček, y J. Voříšková, 2012. "Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition". *The ISME Journal*, **6**: 248-258.
- Bhattacharyya, P.N., y D.K. Jha, 2012. "Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture". *World J Microbiol Biotechnol.*, **28**: 1327-1350.
- Bloemberg, G.V., y B.J.J. Lugtenberg, 2001. "Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria". *Current Opinion in Plant Biology.*, **4**: 343-350.
- Caballero, D.M., 2010. "La verdadera cosecha maderable en México". *Rev. Mex. Cien. For.*, **1**: 6-16.
- Catford, J.G.; C. Staehelin, S. Lerat, Y. Piche, y H. Vierheilig, 2003. "Suppres-

- sion of arbuscularmycorrhizal colonization and nodulation in split-root systems of alfalfa after pre-inoculation and treatment with Nod factors". *J. Exp. Bot.*, **54**: 1481-1487.
- Chanway, C.P., y F.B. Holl, 1994. "Ecological growth response specificity of two Douglas-fir ecotypes inoculated with coexistent beneficial rhizosphere bacteria". *Can. J. Bot.*, **72**: 582-586.
- Comisión Nacional Forestal, 2012. CONA-FOR. <http://www.conafor.gob.mx>. Consultada en diciembre de 2013.
- Eckert, A.J., y B.D. Hall, 2006. "Phylogeny, historical biogeography, and patterns of diversification for *Pinus* (Pinaceae): Phylogenetic tests of fossil-based hypotheses". *Mol. Phylo. Evo.*, **40**: 166-182.
- Farmer, E.E., 2001. "Surface-to-air signals". *Nature*, **411**: 854-856.
- Ferreira, A.A.S.; L.F.C. Leite, B.F. Iwata, M.A. Lira Jr., G.R. Xavier, y M.V.B. Figueiredo, 2012. "Microbiological process in agroforestry systems. A review". *Agron. Sustain. Dev.*, **32**: 215-226.
- Flores-Velázquez, R.; M.E. Fuentes-López, J. Quintanar-Olguín, y J.C. Tamarit-Urías, 2013. "Maquinado de cuatro especies maderables de encino de la Sierra de Juárez, Oaxaca". *Rev. Mex. Cien. For.*, **4**: 22-33.
- Frey, K.P.; J. Garbaye, y M. Tarkka, 2007. "The mycorrhiza helper bacteria revisited". *New Phytol.*, **176**: 22-36.
- Glick, B.R.; Z. Cheng, J. Czarny, y J. Duan, 2007. "Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria". *Eur. J. Plant Pathol.*, **119**: 329-39.
- Hallmann, J., y G. Berg, 2006. "Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes". *Soil Biol.*, **9**: 15-32.
- Hass, D., y G. Défago, 2005. "Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads". *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**: 307-319.
- Hernández-Vargas, G.; L.R. Sánchez-Velásquez y F. Aragón, 2001. "Tratamientos pregerminativos en cuatro especies arbóreas de uso forrajero de la selva baja caducifolia de la sierra de Manantlan". *Foresta Veracruzana*, **3**: 9-15.
- Kamilova, F.; L.V. Kravchenko, A.I. Shaposhnikov, N. Makarova, y B. Lugtenberg, 2006. "Effects of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and of the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS365 on the composition of organic acids and sugars in tomato root exudate". *Mol. Plant Microbe Interact.*, **19**: 1121-1126.
- Leyval, C., y J. Berthelin, 1989. "Influence of acid-producing *Agrobacterium* and *Laccaria laccata* on pine and beech growth, nutrient uptake and exudation". *Agr. Ecosyst. Environ.*, **28**: 313-319.
- Lottmann, J.; M. O'Callaghan, D. Baird, y C. Walter, 2010. "Bacterial and fungal communities in the rhizosphere of

- field-grown genetically modified pine trees (*Pinus radiata* D.)". *Environ. Biosafety Res.*, **9**: 25-40.
- Lovey, R.J.; P. Perissé, C. Vieyra y J.C. Coraglio, 2010. "Caracterización de semilla, germinación y plántula de *Cologania broussonetii* (Balb.) DC". *Phyton-Int. J. Exp. Bot.*, **79**: 5-10.
- Lucy, M.; E. Reed, y B.R. Glick, 2004. "Applications of free living plant growth promoting rhizobacteria". *Antonie van Leeuwenhoek.*, **86**: 1-25.
- Lugtenberg, B., y F. Kamilova, 2009. "Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria". *Annu. Rev. Microb.*, **63**: 541-556.
- Martínez-Pérez, G.; A. Orozco-Segovia, y C. Martorell, 2006. "Efectividad de algunos tratamientos pre-germinativos para ocho especies leñosas de la Mixteca Alta Oaxaqueña con características relevantes para la restauración". *Bol. Soc. Bot. México*, **79**: 9-20.
- Meraz, G.G., y R.B. Bonilla, 1999. "Análisis y tratamientos pregerminativos de semillas de *Pinus arizonica* Engelman y *Pinus durangensis* Martínez". Tesis ingeniería forestal. División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma de Chapingo. 75 pp.
- Miransari, M., y D.L. Smith, 2014. "Plant hormones and seed germination". *Environ. Exper. Bot.*, **99**: 110-121.
- Mohammad, G., y R. Prasad, 1998. "Influence of microbial fertilizers on biomass accumulation in potted *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. Seedlings". *J. Trop. For.*, **4**: 47-77.
- Montejo M.W., 2015. "Efecto de *Arthrobacter agilis* UMCV2, *Trichoderma harzianum* y dimetilhexadecilamina en la germinación y crecimiento de *Pinus devoniana* y *Pinus greggii*". Tesis de maestría en ciencias, Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 63 pp.
- Morales H.J., 2014. "Desarrollo de estrategias de propagación en vivero para la conservación de *Pinus martinezii* Larsen". Tesis de maestría en ciencias, Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 88 pp.
- Nelson, L.M., 2004. "Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants". *Crop Management*, **3**: (1) Online.
- Okon, Y.; G.V. Bloemberg, y B. Lugtenberg, 1998. "Biotechnology of biofertilization and phytostimulation". *Agric. Biotechnol.*, 327-349.
- Perry Jr, J.P., A. Graham y M.M. Richardson, 2000. "7 The history of pines in Mexico and Central America". *Ecology and biogeography of Pinus*. pp. 137-149. Cambridge University Press. Cambridge, Inglaterra. 490 pp.
- Ping, L., y W. Boland, 2004. "Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*". *Trends Plant Sci.*, **9**: 263-266.

- Pokojska, B.A., 1982. "The effect of microorganisms, microbial metabolites and plant growth regulators IAA and GA3 on the growth of pine seedlings *Pinus sylvestris* L." *Pol. J. Soil Sci.*, **15**: 137-143.
- Ramírez-Chávez, E.; J. López-Bucio, L. Herrera-Estrella, y J. Molina-Torres, 2004. "Alkamides Isolated from Plants Promote Growth and Alter Root Development in *Arabidopsis*". *Plant Physiol.*, **134**: 1058-1068.
- Reino, J.; Y. González, y J.A. Sánchez, 2008. "Temperatura óptima de germinación y patrones de imbibición de las semillas de *Albizia lebbek*, *Gliricidia sepium* y *Bauhinia purpurea*". *Pastos y Forrajes*, **31**: 209-216.
- Samaniego, P.J.A., 1995. "Estandarización de técnicas para el manejo de semillas de *Swietenia macrophylla* y *Cordia alliodora*". Tesis de maestría en ciencias. Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza, Cartago. Costa Rica. 149 pp.
- Sánchez, J.A.; B.C. Muñoz, L. Hernández, L. Montejo, A.G. Suárez y Y. Torres-Arias, 2006. "Tratamientos robustecedores de semillas para mejorar la emergencia y el crecimiento de *Trichospermum mexicanum*, árbol tropical pionero". *Agronomía Costarricense*, **30**: 7-26.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2010. SEMARNAT. <http://www.semarnat.gob.mx>. Consultada en enero de 2014.
- Timonen, S., y T. Hurek, 2006. "Characterization of culturable bacterial populations associating with *Pinus sylvestris*-*Suillus bovinus* mycorrhizospheres". *Can. J. Microbiol.*, **52**: 769-778.
- Valencia-Cantero, E.; E. Hernández-Calderón, C. Velázquez-Becerra, L.E. López-Meza, R. Alfaro-Cuevas, y J. López-Bucio, 2007. "Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil". *Plant Soil*, **291**: 263-273.
- Velázquez-Becerra, C.; L.I. Macías-Rodríguez, J. López-Bucio, J. Altamirano-Hernández, I. Flores-Cortez, y E. Valencia-Cantero, 2011. "A volatile organic compound isolated from *Arthrobacter agilis* modulates growth of *Medicago sativa* in vitro". *Plant Soil*, **339**: 329-340.
- Zhang, H.; M.S. Kim, V. Krishnamachari, P. Payton, Y. Sun, M. Grimson, M.A. Farag, C.M. Ryu, R. Allen, S. Melo, y P.W. Paré, 2007. "Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*". *Plant J.*, **226**: 839-851.
- Zurita-Valencia, W.; J.E. Gómez-Cruz, E. Atrián-Mendoza, A. Hernández-García, M.A. Granados-García, J.J., García-Magaña, R. Salgado-Garciglia, y N.M. Sánchez-Varga, 2014. "Establecimiento de un método eficiente de germinación *in vitro* y micropropagación del cirimo (*Tilia mexicana* Schlecht.) (Tiliaceae)". *Polibotánica*, **38**: 129-144.

Recibido: 19 marzo 2014. Aceptado: 17 noviembre 2015.