



UNIVERSIDAD DE MATANZAS  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



## Efecto del producto natural IHPLUS® sobre la germinación de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Tomeguín



### Tesis de Diploma en opción al título de Ingeniero Agrónomo

**Autor:** Maylena Milián Moreno

**Tutores:**

Dr.C. Maykelis Díaz Solares

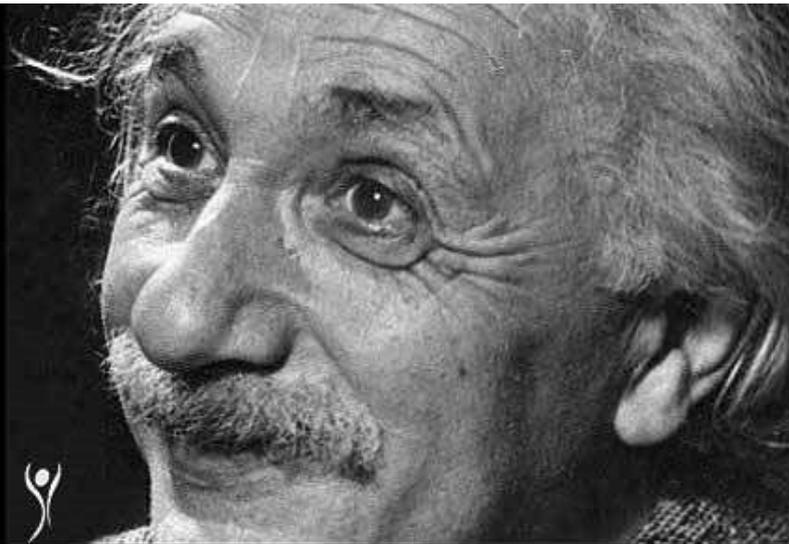
MSc. Yunel Pérez Hernández

Julio, 2018

# PENSAMIENTO

*La medida de  
la inteligencia  
es la capacidad  
de cambiar*

*A. Einstein*



## **Declaración de Autoridad**

Declaro que yo, Maylena Milián Moreno soy la única autora de este Trabajo de Diploma, en calidad de lo cual autorizo a la Universidad de Matanzas a hacer uso del mismo con la finalidad que estime pertinente.

---

Firma

## **DEDICATORIA**

A mi mamá Xiomara y mi papá Omar, por ser los impulsores de esta carrera, por lograr que me mantuviese firme y fuerte, y no permitir que flaquease ante las adversidades que se me presentasen durante su transcurso.

A mi esposo por su apoyo y paciencia durante estos años, por confiar en mí, por ayudarme y por quererme tanto.

A mi hermanita que es la luz de mis ojos y mi inspiración.

## **AGRADECIMIENTOS**

Le agradezco a mi mamá por ponerle de ejemplo y firme para mostrarme que este era el camino correcto y que debía esforzarme y llegar hasta el final. Gracias por ser mi fortaleza y mi guía, por ser mi musa y mi modelo, por ser lo que más quiero. Te amo, te adoro, eres mi tesoro.

A mi papá Omar por todo su apoyo y amor, su ayuda me permitió llegar hoy aquí y lograr mis metas. Te agradezco con todo mi corazón por ser el mejor papá del mundo, eres más de lo que cualquier hija pudiera desear, ¡mucho más! Te amo con todo mi corazón.

A mis padres: Xiomara y Omar

Nunca existirán las palabras para expresar mi agradecimiento, no solo por esto, sino por todo, por la vida que me han dado, la enseñanza, la guía, el cariño, el amor, son perfectos, GRACIAS. Los amo mucho mucho....

A mi esposo Adrián que ha estado conmigo durante todo este trayecto, me ha apoyado y ayudado en todo momento, siempre confiando en mí y me ha brindado todo su amor y cariño. Eres el amor de mi vida. Te amo con todo mi corazón. Gracias.

A mi hermanita que es la luz de mis ojos, mi vida y lo más grande que existe en este mundo para mí, que siempre se ha portado tan bien cuando se trata de cosas de la escuela de su tata y que su amor me da tanta fuerza y felicidad.

A mis compañeros de aula, los cuales sin su apoyo esto no hubiese sido posible, les agradezco con toda mi alma y los llevaré en mi corazón por toda la vida.

A mis tutores por toda su ayuda y apoyo, por toda la paciencia y por la buena atención.

A todos los profesores de la facultad de ciencias agropecuarias que de una u otra forma formaron parte de mi educación y de mi vida en estos años. Gracias.

A muchos otros amigos, familiares y compañeros que durante este tiempo aportaron su granito de arena en mi vida.

## OPINIÓN DEL TUTOR

Por medio de la presente hacemos constar que el Trabajo de Diploma presentado en opción al título de Ingeniero Agrónomo titulado: “Efecto del IHPLUS® sobre la germinación de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Tomeguín, es resultado de una consagrada labor científica de la aspirante Maylena Milián Moreno.

La bibliografía fue adecuadamente consultada y de actualidad. Los resultados responden a una tarea de un proyecto nacional del Programa de Alimento Animal y pueden ser presentados como artículos científicos y en eventos relacionados con la temática.

La aspirante ha demostrado independencia y capacidad de asimilar los criterios que oportunamente le brindaron diferentes profesores, lo que le permitió realizar un análisis interdisciplinario de los resultados del trabajo y que consolidan su preparación como futura profesional de la rama agropecuaria. Asimismo, demostró disciplina y preocupación, lo que posibilitó la culminación exitosa de su investigación.

Quisiéramos plantear que, dada nuestra condición de Tutores, asumimos nuestra total responsabilidad con los aciertos y dificultades que este documento pudiera presentar.

Tutores:

---

Dra.C. Maykelis Díaz Solares

---

MSc. Yunel Pérez Hernández

## RESUMEN

La agricultura tradicional está basada en la aplicación de altos niveles de fertilizantes y plaguicidas químicos, desde la década del 40 del siglo pasado. Sin embargo, el uso excesivo de los mismos impacta negativamente sobre el medioambiente al elevar la contaminación del suelo, las aguas y el riesgo sobre la salud humana. Por lo tanto, constituye una prioridad para la agricultura actual la búsqueda de alternativas agroecológicas más amigables con el medioambiente como los biofertilizantes y los microorganismos eficientes, elaborados a partir de microorganismos presentes en el suelo. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del producto natural IHPLUS® en el proceso de germinación de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Tomeguín. Se estudiaron 10 tratamientos: control (agua destilada), tres concentraciones (2, 4 y 6%) y tres tiempos de inmersión (2, 4 y 6 horas). Las semillas se sembraron en placas Petri de 10 cm de diámetro sobre soporte de papel de filtro humedecido con agua destilada. Se evaluaron los indicadores siguientes: porcentaje de germinación, vigor, longitud de raíz y parte aérea, actividad  $\alpha$ -amilasa y el contenido de proteínas, carbohidratos solubles y azúcares reductores. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con cuatro réplicas por tratamiento. Los resultados se analizaron a través de un ANOVA de clasificación simple, utilizando la Prueba de Tukey para los datos que cumplieron los supuestos. En los casos que no se cumplieron se analizaron mediante la Prueba de Kruskal-Wallis. Para ello se empleó el paquete SPSS versión 15.0. Los tratamientos con IHPLUS® mostraron un efecto positivo sobre el proceso de germinación. Se observó un incremento en el porcentaje de germinación en las primeras 24 y 48 h de iniciado el experimento y se adelantó el día pico de emergencia en los tratamientos con el producto con relación al control. Se obtuvieron valores superiores en la longitud de la raíz y de la parte aérea, así como del valor germinación. Estas respuestas positivas se relacionaron con una mayor actividad  $\alpha$ -amilasa, así como el aumento de los azúcares reductores y proteínas solubles como resultados de un incremento en el metabolismo de estos compuestos. Se recomienda la aplicación del IHPLUS® para los procesos germinativos de otros cultivos y que se incorpore dentro de los productos naturales utilizados en la agricultura cubana actual.

**Palabras claves:** frijol, productos naturales, porcentaje de germinación, proteína, azúcares reductores.

# Índice

1. INTRODUCCIÓN .....	1
Hipótesis científica: .....	2
Objetivo general:.....	2
Objetivo específicos: .....	2
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. El cultivo del frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) .....	3
2.1.1. Origen y ubicación taxonómica .....	3
2.1.3. Importancia del frijol en Cuba y en el mundo .....	6
2.2. Germinación de las semillas .....	6
2.3. Los productos naturales a partir de microorganismos del suelo .....	8
2.3.2. Microorganismos productores de reguladores del crecimiento.....	11
2.3.3. Los microorganismos eficientes (ME). Concepto y origen .....	14
2.3.3.1. Grupos taxonómicos fundamentales que integran los ME .....	14
2.4. Uso de productos naturales a base de microorganismos en Cuba .....	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
3.1. Material vegetal.....	19
3.2. IHPLUS® .....	19
3.3. Tratamientos.....	20
3.4. Prueba de germinación.....	20
3.4.1. Evaluación del vigor.....	21
3.5. Indicadores morfológicos.....	22
3.6. Indicadores bioquímicos .....	22
3.6.1. Contenido de proteínas solubles totales.....	22
3.6.2. Contenidos de carbohidratos solubles totales.....	22
3.6.3. Contenidos de azúcares reductores .....	23
3.6.4. Actividad enzimática $\alpha$ -amilasa.....	23
3.7. Diseño experimental y análisis estadístico .....	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	25
4.1. Germinación de <i>P. vulgaris</i> L. cv. Tomeguín con la aplicación de IHPLUS® ....	25
4.2. Indicadores de vigor .....	27
4.2.1. Valor de germinación .....	27
4.2.2. Día pico.....	27

4.3. Longitud de las plántulas .....	29
4.5. Indicadores bioquímicos .....	32
4.5.1. Actividad $\alpha$ -amilasa .....	32
4.5.2. Proteínas solubles totales .....	35
5. CONCLUSIONES .....	38
6. RECOMENDACIONES .....	39
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

## 1. INTRODUCCIÓN

El uso de fertilizantes y productos químicos a gran escala constituye todavía la base fundamental de las producciones agrícolas en países desarrollados y subdesarrollados. Desde su inicio con la “Revolución verde” hasta la fecha, aunque se incrementaron los rendimientos de cultivos importantes, no se han cumplido las promesas de reducir el hambre en el mundo. En la actualidad, se debate constantemente en el sector científico y en la población en general, sobre los procesos de eutroficación y contaminación de las aguas con el uso excesivo de estos productos químicos y los riesgos para la salud de hombre. Además, provocan la degradación de los suelos y a la pérdida de la biodiversidad (Das *et al.*, 2013).

Como contraparte a este sistema de producción agrícola, la agricultura sostenible representa una promesa para minimizar el uso de los productos químicos que desequilibran el medioambiente. Los productos naturales a base de microorganismos del suelo, se encuentran dentro de las estrategias para desarrollar el manejo agroecológico de los ecosistemas (Ullah *et al.*, 2012).

La tecnología para el desarrollo de productos con microorganismos se basa en la inoculación de cultivos mixtos de microorganismos benéficos en el suelo, para crear un ambiente favorable para el crecimiento y salud de las plantas (Olle, 2015). Estos productos se emplean para estimular el crecimiento de las plantas por vía directa mediante la producción de reguladores del crecimiento como auxinas, citoquininas y giberelinas o mediante la solubilización de minerales como el fosfato y el hierro (Changas-Junior *et al.*, 2015) o por vía indirecta a través de la producción de antibióticos que reducen los microorganismos fitopatógenos (Grosu *et al.*, 2015). En la actualidad, se emplean en la reducción de contaminantes orgánicos como resultado de la actividad industrial (Khatab *et al.*, 2015).

El producto natural IHPLUS® se elabora en la Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey” en la provincia de Matanzas y su aplicación en varios cultivos ha mostrado un efecto positivo. En este contexto se encuentra enmarcada el presente trabajo que tiene como **problema científico**:

Se desconoce el efecto fisiológico y bioquímico del producto natural IHPLUS® en el proceso de germinación de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Tomeguín.

**Hipótesis científica:**

Si se aplica el producto natural IHPLUS® a semillas de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Tomeguín es posible elevar la capacidad germinativa de este cultivo.

**Objetivo general:**

Evaluar el efecto del producto natural IHPLUS® sobre el proceso de germinación de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Tomeguín.

**Objetivos específicos:**

- Determinar el efecto del producto natural IHPLUS® sobre el porcentaje de germinación y el vigor de las semillas de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Tomeguín.
- Determinar el efecto del producto natural IHPLUS® sobre indicadores fisiológicos y bioquímicos durante la germinación de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Tomeguín.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. El cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

#### 2.1.1. Origen y ubicación taxonómica

El frijol común tuvo su origen, al igual que otras especies de interés agrícola, en el proceso de domesticación empírico realizado desde el período Neolítico por nuestros antepasados (Hernández-López *et al.*, 2013). *P. vulgaris* L. comprende dos acervos genéticos, el Mesoamericano y el Andino, que difieren en sus estructuras y niveles de diversidad genética, tanto en poblaciones silvestres como en las domesticadas (Papa y Gepts, 2003).

La clasificación taxonómica actual del frijol es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Subdivisión: Magnoliophytina

Clase: Magnoliatae

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Género: *Phaseolus*

Especie: *Phaseolus vulgaris* L.

#### 2.1.2. Caracteres botánicos de *Phaseolus vulgaris* L.

*Phaseolus vulgaris* L. es una hierba de ciclo corto de hábito erecto o voluble (Figura 1) (Villalobos *et al.*, 2016). La raíz es pivotante con tendencia fasciculada. Presenta unos nódulos característicos de la familia de las leguminosas ocupados por bacterias del género *Rhizobium*, que fijan nitrógeno atmosférico.

El tallo es herbáceo con sección cilíndrica o levemente angular. Presenta pubescencia con pelos largos o cortos y siempre pelos uncinulados (en forma de gancho) que son característicos del género (Botta *et al.*, 1990).



**Figura 1.** Sembrado con plantas adultas de *Phaseolus vulgaris* L. Fuente: <http://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/phaseolus-vulgaris>.

El tallo puede ser identificado como el eje central de la planta, formado por la sucesión de nudos y entrenudos. Generalmente es de mayor diámetro que las ramas y se origina en el punto de inserción radicular. Puede tener crecimiento determinado o indeterminado.

Las hojas se disponen en forma alterna en el tallo y son trifoliadas con folíolos triangulares, con dos estípulas en la base del pecíolo y estípulas en la base de los folíolos. El folíolo central es simétrico y los laterales asimétricos, todos son ovalados a triangulares, glabros o subglabros (Clara *et al.*, 1990).

Las flores se forman en racimos compuestos que se originan por la actividad de la tríada de yemas ubicadas en la axila de las brácteas primarias. Los racimos pueden ser axilares o terminales, lo cual tiene relación con el tipo de hábito de crecimiento. La morfología floral facilita la autofecundación, que da el carácter de autógena (Figura 2A).

El fruto es una legumbre con distintas formas, tamaño, color, textura y número de semillas, que caracteriza a las distintas variedades. Deriva de un ovario unicarpelar, súpero con placentación marginal (Botta *et al.*, 1990) (Figura 2B).

La semilla es exalbuminada (contienen sus reservas nutritivas en los cotiledones). Tiene una amplia variación de color (blanco, rojo, crema, negro, café, amarillo, beige, etc.) y brillo (opaco, intermedio y brillante) (Figura 2C). La forma y tamaño también son variables. Las hay elípticas, esféricas, arriñonadas, oblongas, etc. y con un peso que puede variar entre 15 a más de 60 gramos las cien semillas.



**Figura 2.** *Phaseolus vulgaris* L. A (izquierda) inflorescencia, B (centro) legumbre, C (derecha) semillas. Fuente: <https://www.google.com.cu/search?biw=1252&bih>.

En Cuba se cultivan numerosas variedades de frijol entre las que se encuentran: ICTA Jutiapan, Selección la Palma, CUT-53, Holguín-518, P-2170, Cabaiguán, Tasumal, P-456, Tomeguín, Triunfo-70, Delicia, CC 259-negro, Milagro Villaclareño y BAT-58, etc. Entre estas, la variedad Tomeguín presenta buenas cualidades morfo-agronómicas con un número promedio de legumbres por planta igual a 17, una cantidad promedio de semillas por legumbre igual a 5 y con un peso aproximado de 24,2 gramos por cada 100 semillas. Estos componentes del rendimiento tributan a una productividad de 3,25 t.ha<sup>-1</sup>. Otros caracteres de interés son la altura (63 cm), el número de entrenudos (14) y un ciclo de 87 días (Villalobos *et al.*, 2016).

### 2.1.3. Importancia del frijol en Cuba y en el mundo

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) representa uno de los cultivos más antiguos cosechados en el mundo, con una gran importancia desde el punto de vista social, económico y alimenticio en muchos países, principalmente en Centro y Suramérica (Torres *et al.*, 2009). Dentro del grupo de las leguminosas comestibles es la especie más importante para Cuba y forma parte de la dieta diaria del cubano junto con el arroz (*Oryza sativa* L.) (Nerey *et al.*, 2010).

En Cuba este cultivo constituye uno de sus principales cultivos, el tercero con mayor área sembrada después del arroz y el maíz (*Zea mays* L.). Durante 2012 se sembraron 123 434 ha del cultivo para una producción de 127 100 toneladas (FAOSTAT, 2014).

El frijol posee propiedades nutricionales muy buenas no solo por su aporte proteico, sino también por ser una fuente de carbohidratos, fibras, vitaminas y una gama amplia de macro y microelementos como Fe, Zn, P, K, Ca, Mn, Na, indispensables para la salud humana (Faure *et al.*, 2013; Espinoza-García *et al.*, 2016).

A pesar de ser una especie ampliamente explotada con fines agrícolas y sometida a numerosos trabajos de mejoramiento genético, muchas variedades que se cultiva son afectadas por factores abióticos como la sequía y bióticos como las enfermedades bacterianas y fungosas, que disminuyen la calidad de la semilla y reducen su germinación. Esta etapa constituye el período de mayor vulnerabilidad dentro del ciclo de vida de los cultivos, de ahí la importancia de potencial este proceso en el frijol (Ghangaokar y Kshirsagar, 2013; Martínez *et al.*, 2014).

## 2.2. Germinación de las semillas

La formación, dispersión y germinación de semillas, son eventos fundamentales en el ciclo de vida de las plantas gimnospermas y angiospermas. La mayoría de las plantas con flores se reproducen por vía sexual. La germinación de las simientes y

el establecimiento de las plántulas son características determinantes para la propagación de las plantas, que tienen importancia económica y ecológica.

Por definición, este proceso presenta varias etapas que comienzan con la entrada de agua hacia la semilla seca madura y termina con la salida de la radícula (o más generalmente, una parte del embrión) a través de las envolturas de la semilla. La germinación es un proceso complejo durante el cual la semilla madura, luego de la imbibición, debe cambiar rápidamente de este estado hacia un programa de desarrollo y preparación para el crecimiento de la plántula (Nonogaki *et al.*, 2010).

Durante el proceso de germinación, las reservas de nutrimentos, principalmente almidón y cuerpos proteicos, son convertidos en compuestos básicos como azúcares simples y aminoácidos que son transportados y oxidados para suplir el crecimiento y el alargamiento del embrión (Taiz y Zeiger, 2006). Las globulinas y las prolaminas son proteínas presentes en las semillas, cuyas cantidades aumentan durante la maduración de las simientes, especialmente al final de este proceso, cuando absorben cantidades considerables de nitrógeno (Miransaria y Smith, 2014). Estas proteínas están localizadas en la membrana celular u otras partes de la semilla. Durante la translocación de las proteínas hacia las diferentes partes de la simiente, se transforman cantidades pequeñas de polipéptidos en otras sustancias. La activación de enzimas proteolíticas como la carboxipeptidasa y la aminopeptidasa, provocan la degradación de las proteínas almacenadas (Wilson, 1986).

La síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) y microtúbulos mitóticos, están entre los cambios que ocurren durante la embriogénesis, y estos pueden ser utilizados como indicadores de la actividad de división y diferenciación celular durante esta etapa. Estos procesos son paralelos, debido a la capacidad de las semillas para tolerar la desecación y adquirir la dormancia (Finkelstein, 2004; de Castro y Hilhorst, 2006).

Las fitohormonas más importantes para el proceso de germinación de las semillas son el ácido abscísico y las giberelinas, las cuales tienen efectos inhibitorio y estimulador sobre la geminación, respectivamente. Los brasinoesteroides y el etileno también potencial dicho proceso. Aunque el ácido indolacético (AIA) puede no ser necesario para la germinación de las semillas, son indispensables para el crecimiento de las plántulas jóvenes (Hentrich *et al.*, 2013). Los cotiledones acumulan ácido indolacético y son la fuente principal de este regulador del crecimiento para las plántulas. En las legumbres, los productos de la amida son la fuente fundamental de AIA en las semillas maduras (Epstein *et al.*, 1986).

Entre los indicadores más importantes que controlan el proceso de la dormancia están los cambios a nivel molecular, como el perfil proteico y el balance entre el ácido abscísico y las giberelinas (Taiz y Zeiger, 2006).

Debido a la alta vulnerabilidad a daños por enfermedades y estreses ambientales como el déficit hídrico, la germinación se considera la fase más crítica en el ciclo de vida de las plantas (Rajjou *et al.*, 2012). Por ello, muchas investigaciones están dirigidas a elevar el porcentaje de germinación y el vigor en condiciones de estrés abiótico y biótico en especies vegetales como *Solanum lycopersicum* L. (Singh *et al.*, 2014), *Onobrychis sativa* L. (Delshadi *et al.*, 2017), *Cucumis sativus* L. (Islam *et al.*, 2016) *Dodonaea viscosa* L. (Yousefi *et al.*, 2017) y entre otros.

Entre las estrategias actuales para lograr este propósito se encuentra el desarrollo de nuevos biopreparados a base de microorganismos estimuladores del crecimiento de las plantas, los cuales se encuentran presentes en la rizosfera (Khan *et al.*, 2015; Rana *et al.*, 2015).

### **2.3. Los productos naturales a partir de microorganismos del suelo**

#### **2.3.1. El suelo como fuente de microorganismos estimuladores del crecimiento**

Las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (RPCP) son un grupo de microorganismos presentes en la rizosfera que promueven el crecimiento de las

plantas. El uso potencial de las RPCP en estrategias integrales para reducir los fertilizantes de nitrógeno y fósforo, constituye un área de estudio importante relacionada con la estimulación del crecimiento y el control biológico de los cultivos.

Estas bacterias estimulan el crecimiento mediante el incremento en la disponibilidad de los nutrimentos. Pueden ser usados como inóculos para la biofertilización, fitoestimulación y el biocontrol y se clasifican de acuerdo con los efectos beneficiosos que promueven (Gwyn, 2006). Las rizobacterias, en cambio, se benefician de los nutrimentos secretados por las raíces de las plantas e influyen positivamente sobre estas, de manera directa e indirecta incrementando el crecimiento (Agrawal *et al.*, 2015).

La interacción planta-rizobacteria puede ser beneficiosa, detrimental o neutral y este balance es una consecuencia tanto del tipo de planta como del suelo (Latour *et al.*, 1996). Las bacterias beneficiosas pueden ser también simbióticas o de vida libre y son abundantes en la cercanía de las raíces (Kloepper *et al.*, 1989). Estas benefician a las plantas a través de la producción de fitohormonas como las auxinas (Gutierrez *et al.*, 1996), de la fijación asimbiótica de N<sub>2</sub> (Kennedy *et al.*, 1997), del antagonismo contra microorganismos fitopatógenos a través de la producción de antibióticos, sideróforos, quitinasa  $\beta$ -(1,3)-glucanasa (Renwick *et al.*, 1991), cianuro (Flaishman *et al.*, 1996) y de la solubilización de fosfatos minerales y otros nutrientes (De Freitas *et al.*, 1997).

Un grupo de bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (BPCP) tales como *Bacillus* (Agrawal y Agrawal, 2013) y *Pseudomonas* (Agrawal y Johri, 2014) fueron utilizadas para elevar el crecimiento de los cultivos. A continuación se resume el efecto de diferentes productos naturales a base de RPCP, sobre indicadores morfofisiológicos en cultivos de interés agrícola (Tabla 1).

**Tabla 1.** Efecto de microorganismos aislados de la rizosfera sobre el crecimiento de las plantas.

Especie	Microorganismo	Efecto	Autor (es)
<i>Oryza sativa</i> L. (variedades Basmati-385 y KSK-282)	<i>Bacillus licheniformis</i> NCCP-59	Aumento del porcentaje de germinación.	Jamil <i>et al.</i> (2014)
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	<i>Bacillus megaterium</i>	Aumento en la longitud de la raíz y la parte aérea.	Chookietwattana y Maneewan (2012)
	<i>Pantoea</i> sp.	Solubilización de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , aumento en la biomasa.	Sharon <i>et al.</i> (2016)
<i>Vicia faba</i> L.	<i>Pseudomonas</i> sp. y <i>Rhizobium</i> sp.	Solubilización de fosfatos, aumento en el porcentaje de germinación, índice de vigor, peso fresco y seco de raíz y parte aérea.	Demissie <i>et al.</i> (2013)
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	<i>Pseudomonas</i> sp.	Producción de AIA, Cianuro de hidrógeno (HCN), solubilización de fosfatos, aumento del porcentaje de germinación y longitud de raíz y parte aérea de plántulas.	Agrawal <i>et al.</i> (2015)
<i>Zea mays</i> L.	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Serrata</i> sp. y <i>Bacillus</i> sp.	Producción de AIA, sideróforos, porcentaje de germinación, longitud de raíz y altura plántula.	Almaghrabi <i>et al.</i> (2014)
<i>Cicer arietinum</i> L.	<i>Streptomyces</i> sp.	Número y peso de los nódulos, peso seco de raíz y tallo, número y peso de legumbre, rendimiento.	Gopalakrishnan <i>et al.</i> (2015)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Burkholderia</i> sp.	Aumento de la altura de la planta, número de hojas / planta, legumbre / planta, nódulos/planta, peso de 100 semillas.	Dasgupta <i>et al.</i> (2015)
<i>Cucumis sativus</i> L.	<i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Actividad fungicida contra <i>Phytophthora</i> sp., incremento de la germinación y vigor de las semillas.	Islam <i>et al.</i> (2016)

El tratamiento de semillas con RPCP mejoró distintos indicadores morfológicos y fisiológicos en plantas, como fue el porcentaje de germinación, el vigor de las semillas, la emergencia, el crecimiento de las raíces, del brote, de la biomasa total,

del peso de la semilla, de la floración temprana y del rendimiento (Agrawal *et al.*, 2014).

### **2.3.2. Microorganismos productores de reguladores del crecimiento**

Las plantas producen fitohormonas o reguladores del crecimiento vegetales, los cuales constituyen compuestos que a concentraciones bajas ( $\leq 1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) pueden regular el crecimiento y desarrollo de los vegetales. Existen seis clases de fitohormonas: auxinas, citoquininas, brasinoesteroides, giberelinas, ácido abscísico, etileno y recientemente fueron descubiertas las estrigolactonas. Estas sustancias regulan procesos como la división, la expansión y la diferenciación celular, la formación de nuevas ramas y la muerte celular. Las rutas bioquímicas en las que participan las fitohormonas y las interacciones entre estas, tienen una función importante en la coordinación de la respuesta celular (Santner *et al.*, 2009).

Muchas bacterias presentes en la rizosfera pueden producir reguladores del crecimiento vegetal en condiciones *in vitro*, tales como las auxinas, las citoquininas, las giberelinas, el ácido abscísico y el etileno (Zahir *et al.*, 2003). Las bacterias que producen ácido abscísico y etileno se conocen como controladoras del estrés. Hasta el momento no se conoce que los brasinoesteroides y las estrigolactonas sean producidas por bacterias u hongos.

Las fitohormonas producidas por los microorganismos pueden modular los niveles hormonales endógenos de las plantas y en consecuencia tienen una influencia considerable sobre el crecimiento y desarrollo (Van Loon, 2007). A continuación se hace referencia a aspectos generales sobre los reguladores que promueven el crecimiento de los vegetales.

Las auxinas tienen funciones importantes en la regulación de diferentes funciones como el ciclo celular, el crecimiento y desarrollo, la formación de los tejidos vasculares y el polen (Ni *et al.*, 2002), así como el desarrollo de otras partes de la planta (He *et al.*, 2000). El ácido 3-indolacético (AIA) no conjugado es el miembro de las auxinas más abundante.

La producción de ácido indolacético por bacterias de la rizosfera y su efecto en el crecimiento de los vegetales fue demostrada por numerosos autores en diferentes cultivos de interés agrícola como *Triticum aestivum* L. (Khatab *et al.*, 2015), *Cicer arietinum* L. (Biswas *et al.*, 2014), *Solanum lycopersicon* L. (Agrawal y Agrawal, 2013) y *Lactuca sativa* L. (Gomez *et al.*, 2003), entre otros. Se considera que la estimulación del crecimiento por auxinas adicionadas exógenamente puede actuar mediante un incremento del crecimiento de las raíces, la longitud y el área superficial, lo cual permite a la planta acceder a una mayor cantidad de nutrientes y agua del suelo.

En estudios realizados por Giassia *et al.* (2016) se identificaron varios grupos de microorganismos promotores del crecimiento presentes en la rizosfera como actinobacterias, bacterias ácido lácticas y bacilos, los cuales mostraron la capacidad de producir ácido indolacético y algunas de las cepas fueron además capaces de solubilizar el fósforo y el nitrógeno. Estos autores encontraron que la respuesta depende del genotipo en cuestión.

Nghia *et al.* (2017) aislaron la cepa bacteriana ST2- 1 presente en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). La misma produjo 33,31 mg.L<sup>-1</sup> de AIA y fue identificada molecularmente como *Bacillus megaterium*.

Las citoquininas pueden ser producidas por un grupo amplio de microorganismos en cultivos puros como por ejemplo, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Serratia* y *Xanthomonas* (García de Salome *et al.*, 2001). El espectro de citoquininas producidas por las rizobacterias es similar a las producidas por las plantas, de las cuales la isopenteniladenina, la trans-zeatina, la cis-zeatina y sus ribósidos son los más comunes (Frankenberger y Arshad, 1995).

Las citoquininas tienen la capacidad de inducir la división celular en las células vegetales en presencia de auxina. Las concentraciones elevadas de auxina promueven la diferenciación hacia la formación de raíces, mientras que cantidades

altas de citoquininas inducen la morfogénesis de los brotes. Concentraciones equimolares promueven la proliferación celular (Taiz y Zeiger, 2006).

Las giberelinas están relacionadas fundamentalmente con la división y el alargamiento celular dentro del meristemo subapical, por lo cual estas moléculas tienen una función importante en el alargamiento de los internodos en los tallos. Otros procesos importantes donde participa esta fitohormona son la germinación, el desarrollo del tubo polínico y la floración de las plantas en roseta. Como sucede en el caso de las auxinas y las citoquininas, las giberelinas actúan principalmente en combinación con otros reguladores (Azcón-Bieto y Talón, 2010).

Durante el proceso de germinación de las semillas almidonosas, el aumento de la concentración de giberelinas estimula la expresión de  $\alpha$ -amilasa en la capa de aleurona. Esta enzima hidroliza las reservas de almidón y eleva la concentración de glucosa que necesita el embrión para obtener de energía metabólica mediante el proceso de respiración celular. El aumento en la concentración de ATP es indispensable para satisfacer las demandas de biosíntesis que se generan durante el proceso de germinación. Por otra parte, durante la oxidación de la glucosa en la glucólisis y en el ciclo de Krebs, se generan esqueletos carbonados para la biosíntesis del resto de las estructuras celulares (Taiz y Zeiger, 2006).

Las bacterias que producen giberelinas tienen la capacidad de secretar estos compuestos al medio. Entre los géneros y especies fundamentales están: *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Clostridium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Xanthomonas* (Tsavkelova *et al.*, 2006).

En trabajos realizados con un cultivo de *Rhizobium* aislado de nódulos de soya (*Glycine max* L.), se observó un aumento en la germinación de *Cicer arietinum* L., *Vigna aconitifolia* (Jacq.), *Phaseolus aureus* Roxb. y *Pisum sativum* L. con la aplicación de la solución bacteriana a las semillas de estos cultivos (Pawar *et al.*, 2014).

### **2.3.3. Los microorganismos eficientes (ME). Concepto y origen**

El concepto y la tecnología de los Microorganismos Efectivos (ME) fue desarrollado por el Profesor Dr. Teruo Higa, en la Universidad de Ryukyus, Okinawa, Japón (Salgado, 2007).

El principio de esta tecnología es introducir un grupo de microorganismos benéficos, para mejorar la condición de los suelos, suprimir los microorganismos putrefactivos (inductores de enfermedades), y mejorar la eficacia en la utilización de la materia orgánica en los suelos (Higa, 2004).

Los microorganismos no sustituyen el accionar de una buena práctica agroecológica de manejo para los sistemas integrados, sin embargo, adiciona una nueva dimensión en la optimización para en el uso de los suelos, en el manejo de los residuales, la rotación de cultivos, la utilización de aditivos orgánicos, la conservación en forma de ensilajes, el reciclaje de los residuos de cosechas y de biocontroles para el tratamiento de plagas (Higa y Wididana, 1991).

Los ME son una mezcla de diferentes microorganismos tanto aerobios como anaerobios con más de 80 cepas, que representan cerca de 10 géneros diferentes y que poseen aproximadamente cerca de 100 millones de microorganismos activos/mL a un pH entre 3,2 y 3,8. Estos microorganismos fisiológicamente compatibles y mutuamente complementarios, coexisten en equilibrio en un cultivo líquido o sólido y pueden ser aplicados como inoculantes para incrementar la diversidad microbiana de suelos y plantas (Zhou *et al.*, 2009).

#### **2.3.3.1. Grupos taxonómicos fundamentales que integran los ME**

Los Microorganismos Eficaces están compuestos por bacterias fotosintéticas o fototróficas no sulfurosas (*Rhodopseudomonas* sp.), bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus* sp.) y levaduras (*Saccharomyces* sp.) en concentraciones superiores a  $10^5$  Unidades Formadoras de Colonias/mL (Ecorganica, 2009). Además, se detectan hongos filamentosos y actinomicetos que se encuentran en grandes

cantidades en la naturaleza y que son capaces de interactuar entre sí (Woodward, 2003).

Las bacterias fotosintéticas no sulfurosas son muy versátiles debido a su plasticidad metabólica, ya que pueden desarrollarse en condiciones anaeróbicas fotoautotróficas y fotoheterotróficas, por medio de la reducción de compuestos inorgánicos y orgánicos, respectivamente (Romero, 2006).

El potencial biofertilizante de este grupo está en características como la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar nutrientes insolubles como fosfatos, descomponer residuos orgánicos, suprimir el crecimiento de patógenos del suelo, degradar tóxicos como pesticidas, reciclar e incrementar la disponibilidad de nutrientes y producir antibióticos y otras moléculas orgánicas simples como tocoferol, licopenos, saponinas, flavonoides y antioxidantes que estimulan el crecimiento de las plantas (Ramírez *et al.*, 2008).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son estrictamente fermentativas, crecen a un pH entre 4,8 y 9,6 y no forman esporas. Este tipo de bacterias promueve la fermentación de materia orgánica y descomponen materiales como lignina y celulosa (Zhou *et al.*, 2009); poseen la capacidad de suprimir microorganismos debido a la producción de sustancias antimicrobianas como ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (antibacterianos), o sustancias parecidas a antibióticos como acidofilina, lactocidina producidas por *Lactobacillus acidophilus*, lactolina producida por *Lactobacillus plantarum* y nisina producida por *Streptococcus lactis* (Visser *et al.*, 1986).

Estos microorganismos también son capaces de reducir poblaciones de nemátodos y controlar la propagación y diseminación de microorganismos patógenos como *Fusarium* sp. (Ström, 2005;), *Pseudomonas* sp. (Cadirci y Citak, 2005), *Xantomona campestris* y *Erwinia caratovora* (Visser *et al.*, 1986).

Las levaduras sintetizan sustancias antimicrobiales útiles a partir de los aminoácidos y los azúcares secretados por las bacterias fototróficas y la materia orgánica

presente en el medio. Las sustancias bioactivas, como hormonas y enzimas producidas por las levaduras, son sustratos útiles para los microorganismos benéficos como las bacterias ácido lácticas (Ecorganica, 2009).

Los hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* actúan descomponiendo rápidamente la materia orgánica para producir alcohol, ésteres y sustancias antimicrobianas, lo que permite la desodorización del medioambiente, además de prevenir la aparición de insectos perjudiciales y gusanos (Saintmartin, 2007). Además, varios autores observaron la capacidad de estos organismos en estimular el crecimiento de distintos cultivos como *Glycine max* (Saxena *et al.*, 2016) y *Hordeum vulgare* cv. Arna (Ignatova *et al.*, 2015).

Los actinomicetos son bacterias Gram positivas, aerobios heterótrofos principalmente y formadores de esporas. El género principal es *Streptomyces*, cuyo olor característico a tierra húmeda se debe a compuestos volátiles como la geosmina. Los miembros de la familia *Streptomycetaceae* se caracterizan por la producción de metabolitos secundarios como enzimas inhibitorias extracelulares, herbicidas y antibióticos (Schlatter *et al.*, 2009). Son capaces de degradar moléculas complejas como celulosa, lignocelulosa, xilano y lignina; además, tienen una función importante en el proceso de descomposición de material orgánico, debido a sus enzimas líticas (Zhou *et al.*, 2009).

Dentro de otras funciones que tienen los actinomicetos está la capacidad de solubilizar fosfatos, lo cual es muy importante ya que el fósforo se encuentra entre un 95-99% en forma insoluble y no puede ser utilizado por las plantas. Por otra parte, poseen gran potencial como controladores de patógenos de plantas debido a la producción de antibióticos ionóforos (incrementan la captura de nutrientes incluyendo cationes) y enzimas que poseen actividad antimicrobiana. Entre estas enzimas está la quitinasa que puede ser aprovechada como mecanismo de biocontrol especialmente de hongos patogénicos. De igual forma, los actinomicetos son capaces de colonizar el sistema de raíz de las plantas (Sousa *et al.*, 2008), se les reconoce por su capacidad de sintetizar auxinas como el AIA que promueve el

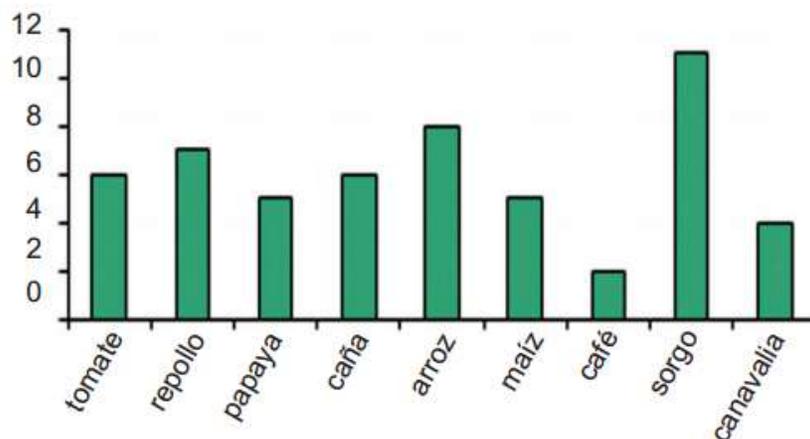
crecimiento de las raíces y la proliferación de pelos radicales, que mejoran la absorción de agua y minerales del suelo.

#### **2.4. Uso de productos naturales a base de microorganismos en Cuba**

En la agricultura cubana los principales géneros microbianos utilizados como biofertilizantes son: *Glomus*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azotobacter*, *Gluconoacetobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Martínez-Viera y Dibut-Álvarez, 2012; Peña Borrego *et al.*, 2015).

Los cultivos agrícolas fundamentales en los cuales se han evaluado un mayor número de microorganismos biofertilizantes son el sorgo (*Sorghum bicolor* L. (Moench) y *Sorghum vulgare* L.), el arroz (*Oryza sativa* L.), la col (*Brassica oleracea* L.), el tomate (*Solanum lycopersicum* L.), la caña (*Saccharum officinarum* L.), el maíz (*Zea mays* L.), la papaya (*Carica papaya* L.) y canavalia (*Canavalia ensiformis* L.). Estos bioproductos, en conjunto con otros factores como el manejo integrado de plagas y la nutrición, han permitido incrementar los volúmenes de producción; aunque en muchos renglones y cadenas productivas, no se satisface la demanda planificada por las autoridades que rigen la política agrícola del país (Peña Borrego *et al.*, 2015).

Según Dibut *et al.* (2010) en Cuba se han beneficiado más de 40 especies vegetales con el uso de los biofertilizantes y bioestimulantes. En la Figura 3 se muestra el número de trabajos relacionados con la aplicación de estos productos naturales por cultivos agrícolas. Como se puede observar, *Phaseolus vulgaris* L., a pesar de ser la legumbre de mayor consumo en el país, no se encuentra entre estos cultivos; por lo cual se requiere de estudios en esta especie de alta demanda en la población, en función de introducir y lograr la aceptación de esos productos al mercado nacional a través del impacto directo en los rendimientos agrícolas.



**Figura 3.** Principales cultivos en los cuales se evaluaron los microorganismos biofertilizantes en Cuba (2008-2012). Fuente: Borrego *et al.* (2015).

En un futuro inmediato, debido a los altos precios de los fertilizantes de nitrógeno y fósforo, se deberán tomar acciones agronómicas para incrementar la toma de nutrientes por las plantas, y el uso de inoculantes microbianos es una de las alternativas, lo que estimularía el desarrollo de los estudios sobre los microorganismos del suelo. En este sentido, el IHPLUS® podría contribuir a las producciones agrícolas de calidad y amigables con el medioambiente.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Centro de Estudios Biotecnológicos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, de la Universidad de Matanzas, Cuba.

#### 3.1. Material vegetal

Se utilizaron semillas certificadas de frijol de reciente cosecha (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Tomeguín), las cuales fueron suministradas por la Estación Provincial de Semillas de Jovellanos, de la provincia de Matanzas.

#### 3.2. IHPLUS®

Los experimentos se realizaron con el lote 31 de inóculo líquido del IHPLUS® que fue caracterizado según el procedimiento normalizado de operación (PNO-LB-M-008/2014) de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey” y los resultados aparecen en la tabla 2.

**Tabla 2.** Caracterización del lote 31.

<b>Características organolépticas</b>	<b>Lote 31</b>
Olor	Agradable a vino
<b>Características físico-químicas</b>	
pH	3,45
<b>Conteo total de microorganismos (UFC)</b>	
Bacterias aeróbias	10 <sup>6</sup>
Bacterias anaeróbias	10 <sup>5</sup>
Hongos y levaduras	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>
Lactobacilos	10 <sup>4</sup>
<b>Ausencia de microorganismos patógenos</b>	
<i>Escherichia coli</i>	No presencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	No determinado
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No presencia
<i>Salmonella typhi</i>	No presencia
<i>Coliformes fecales y totales</i>	No presencia
<i>Shigella</i>	No presencia
<i>Clostridium perfringens</i>	No presencia

El conteo total de los principales grupos de microorganismos benéficos se encontró dentro de lo establecido para la producción y no tuvo crecimiento de patógenos. Además, a los 3 meses de la realización de las pruebas de calidad se volvió a comprobar la ausencia de microorganismos no deseados y se obtuvieron resultados satisfactorios.

### 3.3. Tratamientos

Las semillas de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Tomeguín, fueron tratadas previamente con diferentes concentraciones de IHPLUS® y distintos tiempos de inmersión. Posteriormente, para la germinación, fueron colocadas sobre dos capas de papel de filtro en placas Petri de 10 cm de diámetro (Tabla 3, Figura 4).

**Tabla 3.** Tratamientos utilizados para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de IHPLUS® y tiempos de inmersión sobre la germinación *Phaseolus vulgaris* L. cv. Tomeguín.

Tratamiento	IHPLUS® (%)	Tiempo de inmersión (h)
T1	0	6 (en agua)
T2	2	4 (en agua) + 2 IHPLUS®)
T3	2	2 (en agua) + 4 IHPLUS®)
T4	2	6 (IHPLUS®)
T5	4	4 (en agua) + 2 IHPLUS®)
T6	4	2 (en agua) + 4 IHPLUS®)
T7	4	6 (IHPLUS®)
T8	6	4 (en agua) + 2 IHPLUS®)
T9	6	2 (en agua) + 4 IHPLUS®)
T10	6	6 (IHPLUS®)

### 3.4. Prueba de germinación

La prueba de germinación se realizó en placas Petri de 10 cm de diámetro. Se emplearon cuatro réplicas (placas Petri) por tratamiento con 10 semillas de

*Phaseolus vulgaris* L. cv. Tomeguín cada una. Las semillas fueron colocadas sobre papel de filtro humedecido con agua en una proporción de tres veces el peso del sustrato seco (ISTA, 2010). El proceso de germinación se evaluó diariamente durante 7 días y los resultados fueron expresados en porcentaje de plántulas normales.

El ensayo de germinación se desarrolló en un cuarto de crecimiento a una temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , con un fotoperíodo de 16 h ( $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).



**Figura 4.** Inmersión de las semillas de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Tomeguín en diferentes concentraciones de IHPLUS® (izquierda) y germinación del frijol en el cuarto de siembra (derecha).

#### 3.4.1. Evaluación del vigor

Se determinaron los indicadores de vigor siguientes:

- Día pico: día en el que se observó la mayor cantidad de plántulas (DP) (Murillo, 1998).
- Valor de la germinación (VG) según la fórmula de Djavanshir y Pourbeik (1976).

$$VG = \left( \sum_{i=1}^n Ved_i \right) \left( \frac{Ef}{10N} \right)$$

Donde,

Ved = velocidad de emergencia diaria, calculada como el porcentaje de la emergencia acumulada entre el número de días desde el inicio de la prueba.

N = frecuencia o número de Ved que se calculó durante la prueba.

Ef = porcentaje de la emergencia de plántulas al final de los días de la prueba.

### **3.5. Indicadores morfológicos**

Las longitudes de la raíz y de la parte aérea se midieron en centímetros con el uso de un papel milimetrado.

### **3.6. Indicadores bioquímicos**

La extracción y cuantificación de proteínas, carbohidratos solubles totales y azúcares reductores, se realizó en las raíces y la parte aérea de las plántulas de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Tomeguín, a los siete días de iniciado el experimento de germinación. El material vegetal fue macerado en frío con solución tampón de fosfato de sodio 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0 y en una proporción 1:3 (p/v). El homogenizado fue centrifugado a 10 000 rpm y se colectó el sobrenadante, el cual fue conservado a -20°C hasta el momento de las determinaciones.

#### **3.6.1. Contenido de proteínas solubles totales**

El contenido proteico se determinó colorimétricamente mediante el método descrito por Lowry *et al.* (1951), con el uso de albúmina de suero bovino (BSA) como patrón. Los valores de absorbancia se obtuvieron a una longitud de onda de 750 nm y las concentraciones (mg.mL<sup>-1</sup>) se determinaron mediante la curva patrón.

#### **3.6.2. Contenidos de carbohidratos solubles totales**

El contenido de carbohidratos en las muestras se determinó colorimétricamente mediante el método del fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), con el uso de la D-

glucosa como azúcar patrón. Las muestras fueron leídas a una longitud de onda de 490 nm y las concentraciones expresadas en mg.mL<sup>-1</sup> a partir de la curva patrón.

### 3.6.3. Contenidos de azúcares reductores

El contenido de azúcares reductores fue determinado por el método del ácido dinitrosalísílico y se empleó la D-glucosa (Sigma) como azúcar patrón (Miller, 1959). Los valores de absorbancia fueron leídos a una longitud de onda de 456 nm. La concentración se expresó en mg.mL<sup>-1</sup> a partir de la curva patrón.

### 3.6.4. Actividad enzimática α-amilasa

El extracto enzimático se realizó en frío por homogenización del material vegetal (semillas de siete días de germinadas) en una solución tampón de citrato de sodio pH 5,0 en una proporción 1:2 (p/v). La mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 10 000 rpm y 4°C. El sobrenadante se colectó para la determinación de la actividad enzimática.

La actividad α-amilasa se determinó como se describe a continuación. A 0,4 mL de una solución de almidón al 1% (p/v) en tampón de fosfato de sodio 20 mmol.L<sup>-1</sup> pH 6,9, se le agregó 0,1 mL del extracto enzimático y se dejó reaccionar durante 10 min a 37°C. La reacción se detuvo con la adición de 0,5 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico. Posteriormente la mezcla reaccionante se calentó a 100°C durante 10 minutos y se le agregó 1,2 mL de agua destilada. La absorbancia se determinó a una longitud de onda de 546 nm. La actividad enzimática se expresó como μmoles.min<sup>-1</sup> de glucosa liberados por μg de proteína a pH 6,9 y 37°C.

El cálculo de la actividad enzimática (AE) se realizó mediante la fórmula siguiente:

$$AE = \frac{\mu\text{moles}}{t} \times \frac{V_T}{V_e} \times fd$$

Donde:

$t$  = tiempo del ensayo

$V_T$  = volumen total del ensayo (0,5 mL)

$V_e$  = volumen de la muestra (0,1 mL)

$fd$  = factor de dilución del extracto enzimático

Todas las mediciones espectrofotométricas descritas fueron realizadas en un espectrofotómetro UV/VIS Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Suecia).

### **3.7. Diseño experimental y análisis estadístico**

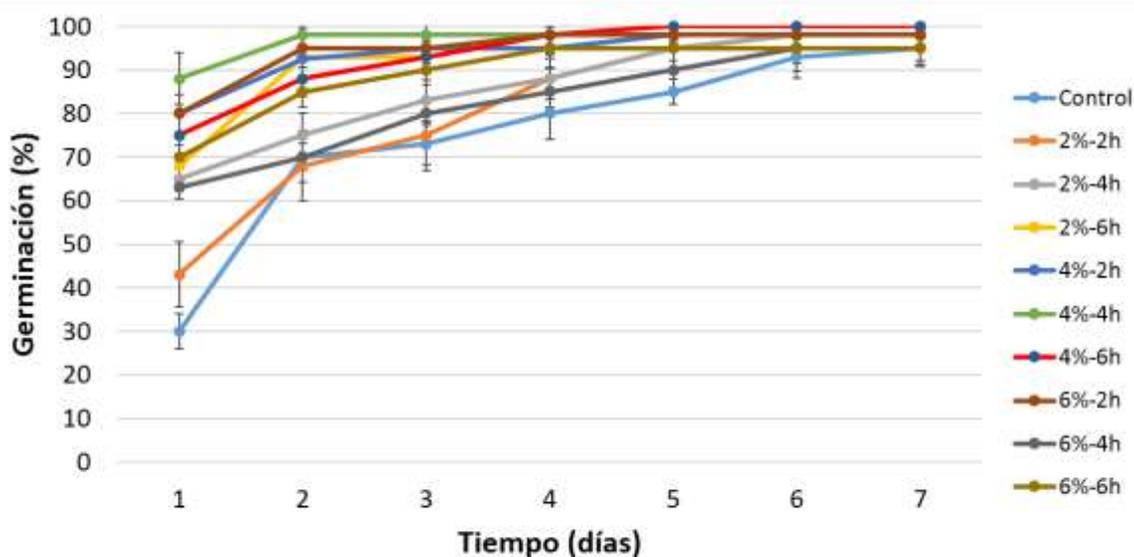
Los ensayos se desarrollaron según un diseño completamente aleatorizado. Para los ensayos de germinación se incluyeron 4 réplicas (placa Petri) por tratamiento. Para los análisis bioquímicos se tomaron cinco muestras por tratamientos, mientras que para la evaluación de parámetros morfológicos y fisiológicos se analizaron 10 plantas.

Los datos fueron procesados con el paquete SPSS versión 15.0 para Windows. Se determinó el ajuste de los datos a una Distribución Normal mediante la prueba de Bondad de Ajuste Kolmogorov-Smirnov y la Homogeneidad de Varianza mediante las Pruebas de Bartlett (Sigarroa, 1985). En los casos en que los datos cumplieron los requisitos exigidos fueron procesados mediante ANOVA de clasificación simple y se realizó la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey HSD ( $P \leq 0,05$ ) para la comparación entre medias. Los datos que no cumplieron con estas premisas fueron analizados mediante la Prueba de Kruskal-Wallis.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Germinación de *P. vulgaris* L. cv. Tomeguín con la aplicación de IHPLUS®

El efecto del producto natural IHPLUS® sobre el porcentaje de germinación de las semillas de *P. vulgaris* se observa en la Figura 6. En las primeras 24 horas de realizada la siembra se observó una mejor respuesta de las semillas tratadas con el producto en comparación con el control (Figura 5). Los tratamientos que mostraron un mayor porcentaje de germinación a las 24 y 48 h fueron 4% - 4h, 4% - 2h, 6% - 2h, con valores superiores al 80% y 90%, respectivamente. A los siete días de siembra, los resultados fueron muy similares entre los tratamientos con el producto y el control, lo que evidencia un buen estado fisiológico y calidad de las semillas.



**Figura 5.** Porcentaje de germinación de semillas de *P. vulgaris* L. cv. Tomeguín tratadas con diferentes concentraciones de IHPLUS® y tiempos de inmersión.

El incremento en el porcentaje de germinación observado en los tratamientos con IHPLUS®, pudo estar relacionado con la presencia de reguladores del crecimiento (auxinas, citoquininas y giberelinas) producidos por los microorganismos del producto, los cuales pueden entrar al interior de la semilla durante el proceso de

imbibición (Giassia *et al.*, 2016). Estos compuestos estimulan procesos como la división y el alargamiento celular que permiten el crecimiento de las diferentes estructuras vegetales (Taiz y Zeiger, 2006; Mohite, 2013).

La producción de reguladores del crecimiento por diferentes microorganismos del suelo, que promueven el crecimiento de las plantas, fue corroborada en numerosas investigaciones (Damam *et al.*, 2016; Thakur *et al.*, 2017).

El aumento en la concentración de giberelina en los tejidos internos de la semilla, ya sea exógena proveniente del producto IHPLUS®, o endógena inducida por componentes del producto natural, pudo estimular el proceso de germinación. En las semillas almidonosas estos compuestos estimulan este proceso, ya que inducen la expresión de la enzima  $\alpha$ -amilasa, la cual hidroliza las reservas nutritivas de almidón para la obtención de glucosa utilizada para la obtención de energía metabólica mediante la respiración celular (Taiz y Zeiger, 2006). Estudios realizados por Karadeniz *et al.* (2006) evidenciaron la capacidad de *Bacillus cereus* para producir giberelinas y otros reguladores como ácido indolacético.

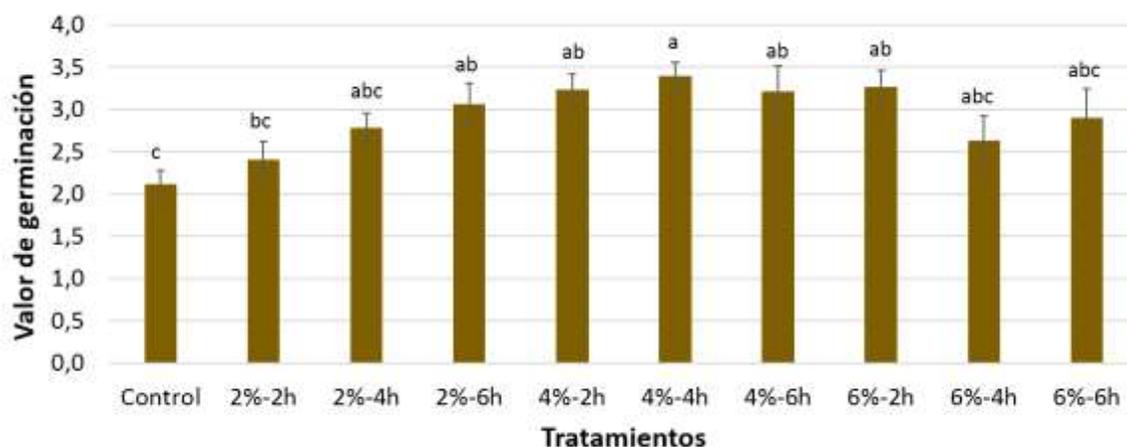
Los resultados obtenidos coinciden con los obtenidos por Aziz *et al.* (2015) con semillas de trigo (*Triticum aestivum* L.) tratadas con cepas bacterianas productoras de auxinas (*Bacillus megaterium* AUX36, *Escherichia coli* AUX53, *Klebsiella pneumonia* AUX137, *Bacillus marinus* AUX142). Estos autores observaron un aumento de la germinación de esta especie, con un aumento en la longitud de la radícula en las semillas inoculadas en comparación con el control.

De manera similar, Babu y Balasaravanan (2017) incrementaron el porcentaje de germinación de *Solanum melongena* L. de un 60 hasta un 97%, luego de inocular semillas de esta especie con soluciones de bacterias promotoras del crecimiento. La aplicación de un biopreparado a base de cepas halotolerantes de *Bacillus megaterium* a semillas de *Solanum lycopersicum* L., mejoró también el proceso de germinación en condiciones de salinidad (Chookietwattana y Maneewan, 2012).

## 4.2. Indicadores de vigor

### 4.2.1. Valor de germinación

La Figura 6 muestra el valor de germinación de las semillas de *P. vulgaris* L. cv. Tomeguín tratadas con diferentes concentraciones y tiempos de inmersión con el IHPLUS®. Los resultados mostraron un efecto positivo del producto sobre este indicador. Los tratamientos que mostraron los valores superiores fueron 2% - 6h, 4% - 2h, 4% - 4h, 4% - 6h, 6% - 2h.



**Figura 6.** Valor de germinación de semillas de *P. vulgaris* L. cv. Tomeguín tratadas con IHPLUS®. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre los tratamientos según el test de Tukey HSD ( $P \leq 0,05$ ).

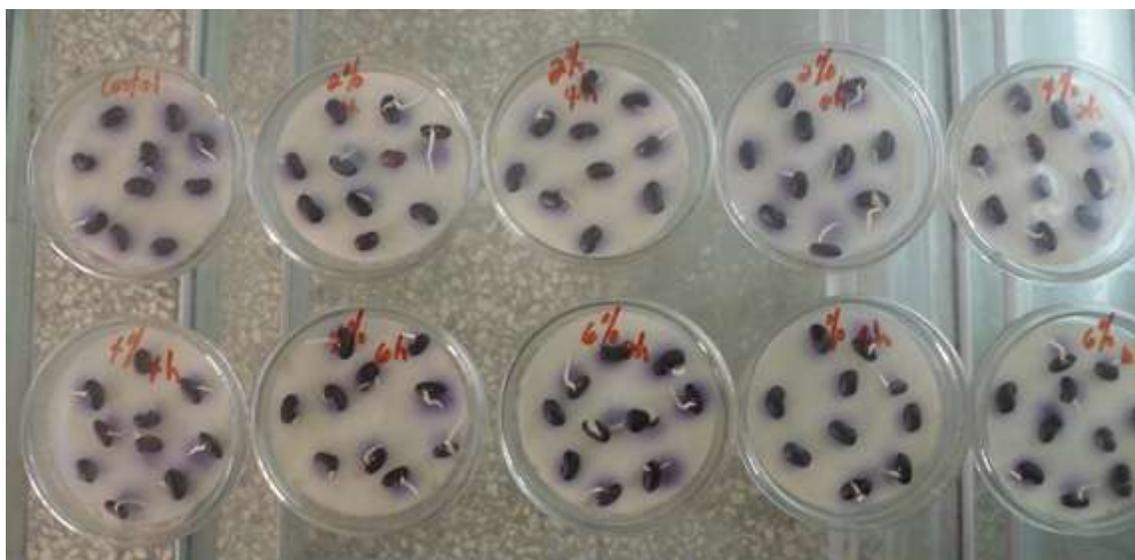
### 4.2.2. Día pico

El día pico durante la germinación se muestra en la Tabla 4. Los tratamientos con el producto natural adelantaron el día pico en 24 h al tratamiento control, cuyo valor más alto de germinación se observó a las 48 h de iniciado el experimento (Figura 7).

**Tabla 4.** Día pico durante la germinación de semillas de *P. vulgaris* L. cv. Tomeguín tratadas con IHPLUS®.

Especie	Tratamientos									
	0%	2% 2h	2% 4h	2% 6h	4% 2h	4% 4h	4% 6h	6% 2h	6% 4h	6% 6h
<i>P. vulgaris</i> L. cv. Tomeguín	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Estos resultados coinciden con los observados en otras leguminosas como *Vicia faba* L., donde se obtuvo un aumento del índice de vigor en las plántulas tratadas con cepas de *Pseudomonas* sp. y *Rhizobium* sp. (Demissie *et al.*, 2013).



**Figura 7.** Germinación de semillas de *P. vulgaris* L. cv. Tomeguín tratadas con diferentes concentraciones de IHPLUS® y tiempos de inmersión. Foto tomada a las 24 h posterior a la siembra en placa Petri. Las imágenes corresponden a la réplica 1 del experimento.

De manera similar, Agrawal *et al.* (2015) determinaron un incremento en el índice de vigor de la germinación en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con semillas tratadas con cepas de *Pseudomonas* sp. productoras de la auxina ácido indolacético. Con la aplicación de este producto microbiológico se aumentó este indicador hasta 124,54 y 741,45% después de 6 y 16 días de germinación, respectivamente. De manera similar, Mahadevamurthy *et al.* (2016) observaron en

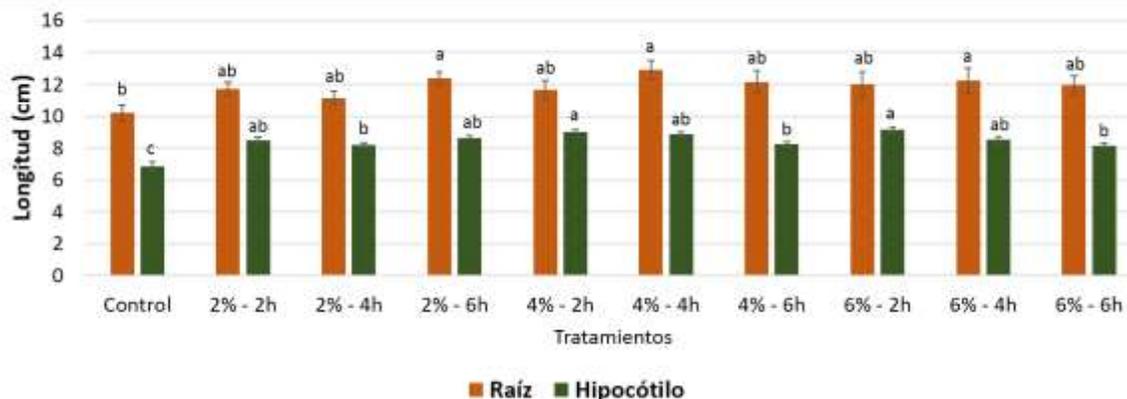
esta especie un aumento en el vigor y el porcentaje de germinación de las semillas tratadas con biofertilizantes a base de hongos presentes en la rizosfera. Mohammed *et al.* (2013) observaron también un incremento en el vigor, la altura y contenido de materia seca de plántulas de *Coffea arabica* L. luego de la inmersión de las semillas en una solución de microorganismos eficientes durante 4,5 horas.

En monocotiledóneas (*Zea mays* L.) también se obtuvieron resultados congruentes con un incremento notable del vigor de las plántulas tratadas con bioproductos obtenidos de bacterias aisladas de la rizosfera (Agbodjato *et al.*, 2016). Estos autores relacionaron el aumento del vigor con una inducción de la síntesis de citoquininas que estimulan la división celular y/o auxinas que promueven el alargamiento de las células.

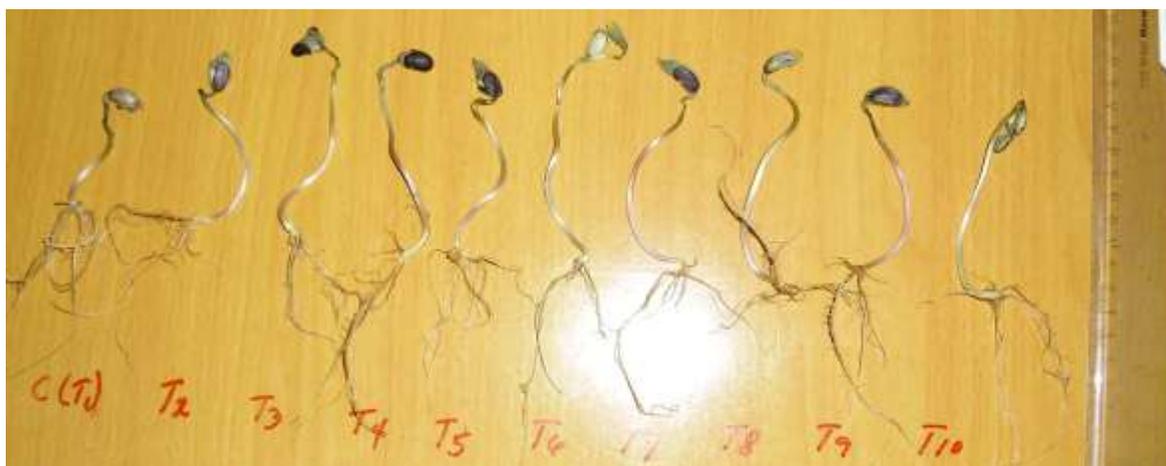
Los resultados también están en correspondencia con los obtenidos por Higa (1991) quien observó un incremento en la velocidad de la germinación, con la aplicación de microorganismos eficientes cuya composición incluía principalmente bacterias ácido lácticas, bacterias fotosintéticas, levaduras y actinomicetos que están presentes comúnmente en el suelo.

### **4.3. Longitud de las plántulas**

El crecimiento de las raíces y de la parte aérea de las plantas de *P. vulgaris* cv. Tomeguín tratadas con el IHPLUS® también mostraron variaciones con relación al control (Figuras 8 y 9). En el caso de las raíces, los valores más elevados fueron referidos para los tratamientos 2%-6h, 4%-4h y 6%-4h, entre los cuales no hubo diferencias significativas. Con relación al crecimiento del hipocótilo, los tratamientos con el producto mostraron valores superiores al control. Entre estos los mejores resultados se obtuvieron con 2% - 6h, 4% - 2h, 4% - 4h, 6% - 2h y 6% - 4h).



**Figura 8.** Longitud de las raíces e hipocótilo de plántulas de *P. vulgaris* L. cv. Tomeguín, cuyas semillas fueron tratadas con diferentes concentraciones de IHPLUS® y tiempos de inmersión. Los datos corresponden a plántulas de siete días de iniciada la siembra. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo órgano, según Test de Tukey HSD ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 9.** Fotografía de plántulas de *P. vulgaris* L. cv. Tomeguín, cuyas semillas fueron tratadas con diferentes concentraciones de IHPLUS® y tiempos de inmersión.

El efecto positivo que tuvo la aplicación del IHPLUS® en el crecimiento de la raíz y el hipocótilo, pueden estar asociado con el balance fitohormonal que se establece en el interior de las semillas, entre los distintos reguladores del crecimiento endógenos y exógenos sintetizados por los microorganismos del producto (Sang *et al.*, 2014). La inducción de auxina a partir de la interacción de los tejidos del vegetal con bacterias estimuladoras del crecimiento fue referida previamente por otros

autores (Kloepper *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2006). La concentración de auxinas y la interacción entre estas con otros reguladores del crecimiento, tiene una función fundamental en la respuesta fisiológica de las plantas (Lambrecht *et al.*, 2000).

Los resultados obtenidos en la presente investigación coinciden con los obtenidos por diferentes autores, quienes observaron un efecto positivo sobre el proceso de germinación de diferentes especies, luego de aplicar distintos biopreparados a base de microorganismos aislados de la rizosfera. Agrawal *et al.* (2015) observaron un aumento en la longitud de las raíces y de la parte aérea de plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cuyas semillas fueron tratadas con tres cepas de *Pseudomonas* sp. (GKS-V, HPR-I, HPR-III) productoras de la auxina ácido indolacético.

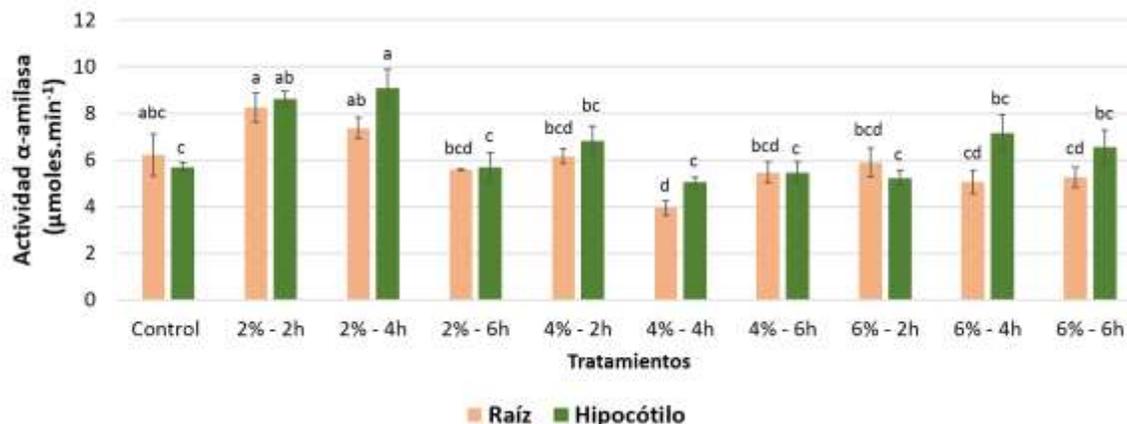
Un efecto positivo similar sobre la germinación y el crecimiento de las plántulas fue referido por Hussain *et al.* (2013) en semillas de *Zea mays* L., las cuales fueron sumergidas en soluciones con bacterias aisladas de la rizosfera. Dichos microorganismos mostraron una buena eficiencia en la producción de ácido indolacético y en la solubilización de fósforo. Los autores de este trabajo también observaron un incremento significativo en la longitud de la parte aérea (39,7%), longitud de la raíz (58,9%), peso fresco (99,0%) y seco (69,4%) de la parte aérea y el peso fresco (97,7%) y seco de la raíz (87,0%).

De manera similar, otros investigadores observaron un aumento en la longitud total o estructuras de plántulas, cuyas semillas fueron tratadas con biofertilizantes a base de microorganismos. En las especies que respondieron positivamente están *Cerasus sachalinensis* Kom. (Qin *et al.*, 2016), *Oryza sativa* L. y *Cicer arietinum* L. (Biswas *et al.* 2005; 2014), *Solanum lycopersicum* L. (Agrawal y Agrawal, 2013).

## 4.5. Indicadores bioquímicos

### 4.5.1. Actividad $\alpha$ -amilasa

La actividad enzimática  $\alpha$ -amilasa en la raíz e hipocótilo de plántulas de *P. vulgaris*, a los siete días de germinación se observan en la Figura 10. Las actividades  $\alpha$ -amilasa en las raíces de las plántulas no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos con el producto y el control; mientras que en el hipocótilo los tratamientos 2%-2h y 2% - 4h, mostraron valores de actividad enzimática superiores al control. En el resto de los tratamientos no hubo diferencias con el testigo o fue inferior la actividad  $\alpha$ -amilasa.



**Figura 10.** Actividad  $\alpha$ -amilasa en las raíces y en la parte aérea de plántulas de *P. vulgaris* L. cv. Tomeguín de siete días de germinación, provenientes de semillas tratadas con diferentes concentraciones de IHPLUS® y tiempos de inmersión. Letras diferentes indican diferencias significativas según Test de Tukey HSD ( $P \leq 0,05$ ).

El aumento en la actividad  $\alpha$ -amilasa en los tratamientos con IHPLUS® observados, puede estar relacionado con la presencia de giberelinas en el producto evaluado y su absorción por las semillas durante el proceso de imbibición. El aumento en los niveles de esta fitohormona en los tejidos vegetales pudo inducir la expresión de la enzima  $\alpha$ -amilasa (Taiz y Zeiger, 2006). La actividad de esta enzima tiene una acción fundamental en la generación de cantidades elevadas de energía metabólica para el crecimiento y desarrollo de todas las estructuras embrionarias.

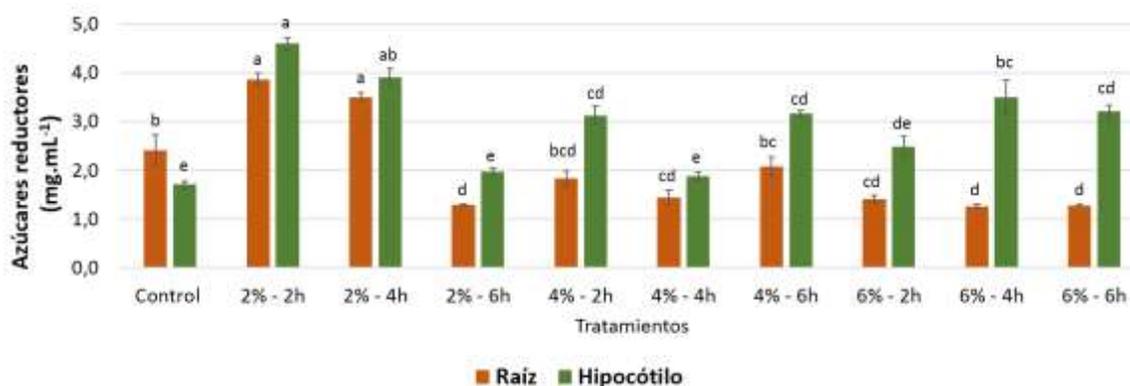
Resultados similares fueron obtenidos con semillas de arroz y leguminosas (Duarah *et al.*, 2011) y maíz (de Morais *et al.*, 2016) tratadas con biopreparados de rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas. Esta enzima hidroliza el almidón en azúcares metabolizables, los cuales proveen energía para el crecimiento de las raíces y la parte aérea de las plántulas (Akazawa y Nishimura, 2011).

El aumento observado en la actividad  $\alpha$ -amilasa también está en correspondencia con los resultados observados por Mohd Din *et al.* (2014). La aplicación de bioproductos desarrollados con las rizobacterias *Nitrosomonas europaea*, *Rhodopseudomonas palustris* y *Acinetobacter* a semillas de dos variedades de *Oryza sativa* L. (Panderas y SK1), mostraron un aumento en la actividad  $\alpha$ -amilasa durante el proceso de germinación en algunos tratamientos con los biofertilizantes. Los mejores resultados se obtuvieron con la combinación *Nitrosomonas europea* + *Acetobacter* sp. a los cinco días de germinación. Sin embargo, la aplicación de los bioproductos con las bacterias individualmente mostró resultados en algunos casos superiores a otras combinaciones con dichas cepas bacterianas. Por otra parte, en algunos tratamientos los resultados no fueron similares al comparar ambos cultivares. Los valores obtenidos evidenciaron que en la actividad amilolítica influyeron numerosos factores como el genotipo de la planta, la composición y concentración de microorganismos presentes en el biofertilizante y el momento fisiológico de la planta.

Nogueira *et al.* (2014) también observaron un incremento de la actividad  $\alpha$ -amilasa en plántulas de *Oryza sativa* L. inoculadas con la bacteria rizosférica *Pseudomonas synxantha*, a los 5 y 14 días de iniciado el proceso de germinación. Los patrones electroforéticos del tratamiento con la bacteria mostraron manchas en el gel más notables, en comparación con las semillas no tratadas.

En la presente investigación solo se observó un aumento en la actividad amilolítica en dos tratamientos con el IHPLUS®; sin embargo, pudo ocurrir un aumento notable en la expresión de esta enzima en los primeros días del experimento donde la actividad metabólica es muy intensa.

Los azúcares reductores en la raíz y en el hipocótilo de las plántulas se muestran en la Figura 11. En las raíces, el mayor contenido de azúcares reductores se observaron en los tratamientos 2% - 2h y 2% - 4h, los cuales fueron superiores al control. En el resto de los tratamientos los resultados fueron similares o inferiores al testigo. Con relación al hipocótilo los tratamientos 2%-2h, 2%-4h, 4%-2h, 4%-6h, 6%-4h y 6%-6h.



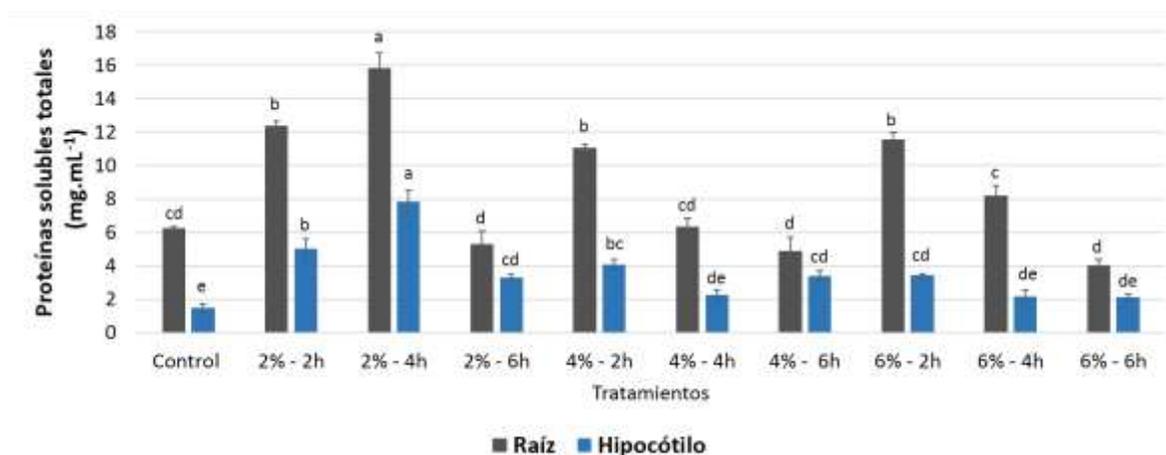
**Figura 11.** Contenido de azúcares reductores en la raíz y en la parte aérea de plántulas de *P. vulgaris* L. cv. Tomeguín de siete días de germinadas y tratadas con diferentes concentraciones de IHPLUS® y tiempos de inmersión. Letras diferentes indican diferencias significativas según Test de Student-Newman-Keuls ( $P \leq 0,05$ ).

El incremento en el contenido de azúcares reductores pudo ser consecuencia de un aumento de la actividad amilolítica en los tejidos vegetales en diferentes momentos durante la germinación de las semillas. En estudios realizados en *Zea mays* L. por Agbodjato *et al.* (2016) y De Moraes *et al.* (2016), donde se inocularon semillas en soluciones con *Pseudomonas fluorescens* - *P. putida* y *Azospirillum brasilense*, respectivamente, se observó un aumento de la germinación que fue relacionado con la síntesis de giberelinas por los microorganismos, las cuales estimulan la expresión de enzimas como la  $\alpha$ -amilasa necesarias para la degradación y asimilación del almidón.

#### 4.5.2. Proteínas solubles totales

El contenido de proteínas solubles totales en las raíces y en la parte aérea de *P. vulgaris* cv. Tomeguín, se muestra en la Figura 12. En las raíces los tratamientos con los valores más altos fueron 2% - 4h, 2% - 2h, 4% - 2h y 6% - 2h, los cuales fueron superiores al control. En el caso del hipocótilo, la mayoría de los tratamientos con el producto natural mostraron valores superiores al control. Solamente en los tratamientos 4% - 4h, 6% - 4h y 6% - 6h se obtuvieron resultados similares al testigo.

Estos resultados evidencia un incremento en el metabolismo de las proteínas, lo cual puede estar relacionado con una mayor disponibilidad de azúcares reductores como la glucosa, que no solo pueden ser utilizados para la obtención de energía metabólica, sino también para la obtención de esqueletos carbonados como resultado de la oxidación de la glucosa y que constituyen la materia prima para la síntesis de aminoácidos y proteínas. Por otra parte, la aplicación del producto pudiera inducir la expresión y/o actividad de otras enzimas como las que participan en la traducción o las proteasas que hidrolizan las proteínas almacenadas y que proveen una fuente de aminoácidos para síntesis proteica *de novo*.



**Figura 12.** Contenido de proteínas solubles totales en la raíz y en el hipocótilo de plántulas de *P. vulgaris* L. cv. Tomeguín de siete días de germinadas y tratadas con diferentes concentraciones de IHPLUS® y tiempos de inmersión. Letras diferentes indican diferencias significativas según Test de Tukey SHD ( $P \leq 0,05$ ).

De manera general, los resultados obtenidos evidencian que el uso de productos naturales a base de microorganismos presentes en el suelo de hábitats naturales, pueden tener un efecto beneficioso en la germinación y crecimiento de las plántulas, con un mínimo de impacto ambiental. La aplicación de estos productos puede constituir una vía para reducir el consumo elevados de fertilizantes químicos, lo que contribuye a reducir eutroficación y otros problemas ambientales (Agamy *et al.*, 2013; Pérez-Montano *et al.*, 2014).

#### **4.6. Valoración económico-ambiental de la aplicación del producto natural IHPLUS®**

Los productos naturales a base de microorganismos contribuyen al crecimiento y al desarrollo de los cultivos a través de la supresión de patógenos y agentes que provocan enfermedades a las plantas, la solubilización de los minerales, la producción de metabolitos como las fitohormonas que estimulan el crecimiento de los tejidos vegetales, la conservación de energía, el mantenimiento del balance microbial del suelo, el incremento de la eficiencia fotosintética y la fijación del nitrógeno biológico (Sang *et al.*, 2014; Olle, 2015).

El producto IHPLUS® producido por la Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey”, constituye un biopreparado con amplio espectro para el sector agropecuario. En el contexto económico actual que enfrenta nuestro país, el empleo de productos de este tipo que sean eficaces y estimulen el crecimiento y desarrollo de los cultivos son de vital importancia. Esto se debe no solo a la acción que tienen sobre el crecimiento vegetal, sino también a otras razones de peso como la reducción en el gastos por concepto de fertilizantes químicos que contaminan el ambiente y aceleran la erosión de los suelo.

Desde el punto de vista económico, la tecnología de estos productos naturales es barata y sencilla y tiene una buena aceptación entre los agricultores del territorio;

por lo cual es sostenible y hasta el momento no se refiere algún impacto negativo sobre los ecosistemas agroecológicos donde se ha aplicado el producto.

El estudio económico realizado al producto IHPLUS® por la subdirección de Economía y Servicios, de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey”, demostró que el costo de producción de un kilogramo de inóculo sólido fue de 3,68 CUP y de un litro de inóculo líquido fue de 0,38 CUP. En la actualidad, este bioproducto tiene buena aceptación por parte de productores del sector cooperativo y estatal no solo por el bajo costo de producción, sino también por el rendimiento que se han alcanzado en los cultivos y su uso como probiótico en animales.

## 5. CONCLUSIONES

- El biofertilizante IHPLUS® aceleró el proceso germinativo de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Tomeguín, al elevar el porcentaje de germinación de las semillas en las primeras 48 h y disminuir el valor del día pico de las semillas tratadas con el bioproducto.
- El valor de germinación y los valores de longitud de la raíz y de la parte aérea de las plántulas tratadas con IHPLUS® mostraron, en general, una respuesta superior al tratamiento control. Con relación al crecimiento la respuesta del hipocótilo fue superior en comparación con la raíz.
- La actividad  $\alpha$ -amilasa mostró un incremento del hipocótilo y de la raíz en los tratamientos 2% (2 y 4h) con IHPLUS®, lo que se relacionó con el aumento de los azúcares reductores en estos tratamientos.
- La aplicación del producto natural IHPLUS® estimuló el metabolismo proteico en raíces y parte aérea de las plantas.
- Los mejores resultados en el proceso germinativo se obtuvieron con los tratamientos 2%-6h, 4% (2, 4 y 6h) y 6%-2h.

## 6. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios similares de germinación en condiciones de campo con la aplicación del biofertilizante IHPLUS® directamente en el suelo o el sustrato.
- Evaluar la respuesta de otros cultivos durante el proceso de germinación con la aplicación del IHPLUS®.
- Cuantificar la presencia de auxinas, citoquininas y giberelinas en el biofertilizante mediante HPLC y cromatografía en capa fina.
- Evaluar el efecto del biofertilizante durante las etapas de germinación y crecimiento vegetativo temprano, en condiciones de estrés hídrico y salino, para determinar la efectividad del mismo en condiciones de estrés abiótico.
- Utilizar las dosis de 2% y 4% de IHPLUS® para estimular la germinación de *Phaseolus vulgaris* L. en condiciones de producción.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agamy, R., Hashem, M. & Alamri S. 2013. Effect of soil amendment with yeasts as bio-fertilizers on the growth and productivity of sugar beet. *Afr J Agric Res.* 8: 46–56.
- Agbodjato, N.A., Noumavo, P.A., Agbessi, A.A.L. & Baba-Moussa, L. 2016. Synergistic effects of plant growth promoting rhizobacteria and chitosan on in vitro seeds germination, greenhouse growth, and nutrient uptake of maize (*Zea mays* L.). *Biotechnology Research International*. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7830182>.
- Agrawal, P.K. & Johri, B.N. 2014. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria from rhizospheric soil of Himalayan region. *Octa J Biosci.* 2 (2): 69-75.
- Agrawal, P.K. & Agrawal, S. 2013. Characterization of *Bacillus* sp. Strains isolated from rhizosphere of tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) for their use as potential plant growth promotin rhizobacteria. *Int. J. Curr. Microbiol. App Sci.* 2 (10): 406-417.
- Agrawal, P.K., Agrawal, S., Kundan, R. & Bhatt, M. 2014. Application and perspective of plant growth promoting rhizobacteria in development of sustainable agriculture. *Inter J of Curr Res.* 6 (10): 9044-9051.
- Agrawal, P.K., Kunda, R. & Agrawal, S. 2015. Characterization of *Pseudomonas* sp. from rhizosphere of tomato plants (*Lycoerpsicon esculentum*) and its efficacy on plant growth promotion. *Journal of Biological & Scientific Opinion.* 3 (3): 114-121.
- Akazawa, T. & Nishimura, H. 2011. Topographic aspects of biosynthesis, extracellular secretion, and intracellular storage of proteins in plan cells. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 441-472.
- Almaghrabi, O.A., Abdelmoneim, T.S., Albishri, H.M. & Tarek, A.A. 2014. Moussa. Enhancement of Maize Growth Using Some Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) Under Laboratory Conditions. *Life Sci J.* 11(11): 764-772.
- Azcón-Bieto, M.J. y Talón, R. 2000. Fisiología de las plantas y el estrés. In: *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Edicions Universitats Barcelona, pp 481-499.

- Aziz, K., Nawaz, M., Nazir, J., Anjum, A.A., Yaqub, T., Ahmad, M.U.D., Rehman, M.U., Aziz, G. & Khan, M. 2015. Isolation, characterization and effect of auxin producing bacteria on growth of *Triticum aestivum*. *The Journal of Animal & Plant Sciences*. 25(4): 1003-1007.
- Babu, D. & Balasaravanan. 2017. Evaluation of the efficiency of plant growth promoting rhizobacteria and its effect on germination of *Solanum melongena* L. seeds. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*. 6(1): 576-581.
- Biswas, S., Lahiri, P. & Das, S. 2014. A study on the role of a close homologue of *Bacillus cereus* isolated from *Metaphire posthumaon* germination of gram (*Cicer arietinum* L.) seeds for its use as biofertilizer. *Journal of Global Biosciences*. 3(4): 708-713.
- Biswas, S., Lahiri, P., Ghosh, P., Dutta, A. & Das, S. 2005. Facilitation of seed germination using distinct resident bacteria from the gut of earthworm *Metaphire posthuma*, *Indian Agriculturist*. 49(4): 233-237.
- Botta, S., Del Piñal, C.S., De la Luz, M., Cortázar, R. & Leiseca, A. 1990. Manual de Botánica Sistemática. Apuntes para un libro de texto. Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias de la Habana.
- Cadirci, B. & Citak, S. 2005. A comparación of Two Methods Used for Measuring Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria. *Pakistan Journal of Nutrition*. 4(4): 237-241.
- Changas-Junior, .A.F., de Oliveira, A.G., De Oliveira, L.A., dos Santos, G.R., Changas, L.F.B., Lopes da Silva, A.L. & da Luz Costa, J. 2015. Production of indole-3-acetic acid by bacillus isolated from different soils. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 21 (2): 282–287.
- Chookietwattana K. & Maneewan, K. 2012. Screening of efficient halotolerant phosphate solubilizing bacterium and its effect on promoting plant growth under saline conditions. *World Applied Science Journal*. 16 (8): 1110-1117.
- Clara, S., Sara, B., Ortega, M., de la Cruz, M., Castro, E., Suárez, S., Gortázas, R. & Rodríguez, T. 1990. Botánica General. Departamento de Ediciones del I.S.C.A.H.
- Damam, M., Kaloori, K., Gaddam, B. & Kausar, R. 2016. Plant Growth Promoting Substances (Phytohormones) Produced by Rhizobacterial Strains Isolated from the Rhizosphere of Medicinal Plants. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 37(1): 130-136.

- Das, A.J., Kumar, M. & Kumar, R. 2013. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): An Alternative of Chemical Fertilizer for Sustainable, Environment Friendly Agriculture. *Research Journal of Agriculture and Forestry Sciences*. 1(4): 21-23.
- Dasgupta, D., Ghata, A., Sarkar, A., Sengupta, Ch. & Goutam, P. 2015. Application of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) Isolated from the Rhizosphere of *Sesbania bispinosa* on the Growth of Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 4(5): 1033-1042.
- de Castro, R.D., Hilhorst, H.W.M., 2006. Plant Hormonal control of seed development in GA- and ABA-deficient tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Moneymaker) mutants. *Plant Sci.* 170: 462–470.
- De Freitas, J.R., Banerjee, M.R. & Germida, J.J. 1997. Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus*). *Biol and Fertil of Soils*. 24 84): 358-364.
- de Moraes, T.M., de Brito, C.H., Brandão, A.M. & Rezende, W.S. 2016. Inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* in the seed furrow. *Revista Ciência Agronômica*. 47 (2): 290-298.
- De Moraes, T.P., de Brito, C.H., Branda, A.M. & Rezende, W.S. 2016. Inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* in the seed furrow. *Revista Ciencia Agronômica*. 47 (2): 290-298.
- Delshadi, S., Ebrahimi, M. & Shirmohammadi, E. 2017. Influence of plant-growth-promoting bacteria on germination, growth and nutrients' uptake of *Onobrychis sativa* L. under drought stress. *Journal of Plant Interactions*, 12 (1): 200-208. DOI: 10.1080/17429145.2017.1316527
- Demissie, S., Muleta, D. & Berecha, G. 2013. Effect of phosphate solubilizing bacteria on seed germination and seedling growth of Faba bean (*Vicia faba* L.). *International Journal of Agricultural Research*. 8 (3): 123-136.
- Dibut, A.B. & Rodríguez, A. 2010. Las biotecnologías hechas a la medida: un puente entre la biotecnología y la agroecología. Ejemplo de caso: Los biofertilizantes. *Agricultura Orgánica*. 2: 43-5. ISSN 0717-4829.
- Djavanshir, K. & Pourbeik, H. 1976. Germination value-a new formula. *Silvae Genetica*. 25:79-83.

- Duarah, I., Deka, M., Saikia, N. & Deka, B.H.P. 2011. Phosphate solubilizers enhance NPK fertilizer use efficiency in rice and legume cultivation. *Biotech* 1: 2278-238.
- Dubois, M.K., Gilles, A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substance. *Anal. Chem.* 28:350-356.
- Ecorganica, 2009. Los microorganismos benéficos [En Línea] Disponible en: <http://www.w3.org/TR/xhtml1/DTD/xhtml1-transitional.dtd>. Consulta: diciembre de febrero de 2018.
- Epstein, E., Baldi, B.G. & Cohen, J.D. 1986. Identification of indole-3-acetyl glutamate from seeds of *Glycine max* L. *Plant Physiol.* 80: 256–258.
- Espinoza-García, N., Martínez-Martínez, R., Chávez-Servia, J.L., Vera-Guzmán, A.M., Carrillo-Rodríguez, J.C., Heredia-García, E. & Velasco-Velasco, V.A. 2016. Contenido de minerales en semilla de poblaciones nativas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Rev. Fitotec. Mex.* 39 (3): 215 – 223.
- Faure, B., Benítez, R., León, N., Chaveco, O. & Rodríguez, O. 2013. Guía técnica para el cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agroecológica*. La Habana Cuba; ISBN: 978-959-7210-67-2.
- Finkelstein, R.R. 2004. The role of hormones during seed development and germination. In: Davies, P.J. (Ed.), *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal transduction, Action*. The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 513–537.
- Flaishman, M.A., Eyal, A., Zilberstein, C., Voisard, C. & Hass, D. 1996. Suppression of Septoriatritici Blotch and leaf rust of wheat by recombinant cyanide producing strains of *Pseudomonas putida*. *Mol Plant-Microbe Interact.* 9 (7): 642-645.
- FAOSTAT. 2014. Beans harvested area and production. Disponible en: <http://www.fao.org/statistics>. Consulta: abril, 2018.
- Frankenberger, W.T. & Arshad, M. 1995. *Phytohormones in soils*. Marcel Dekker Inc, New York.
- García de Salome, I.E., Hynes, R.K. & Nelson, L.M. 2001. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can. J. Microbiol.* 47: 404-411.
- Ghangaokar, N.M. & Kshirsagar, A.D. 2013. Study of seed borne fungi of different legumes. *Trends in Life Sciences.* 2(1): 32-35.

- Giassia, V., Kiritani, C. & Kupper, K.C. 2016. Bacteria as growth-promoting agents for citrus rootstocks. *Microbiological Research*. 190: 46-54. Disponible en: <http://www.elsevier.com/locate/micres>.
- Gomez, A.M.A., Mariano R.L.R., Silveira E.B. & Mesquita J.C.P. 2003. Isolamento, seleção de bactérias e efeito de *Bacillus* spp. na produção de mudas orgânicas de alface. *Horticultura Brasileira*. 21: 701–705.
- Gopalakrishnan, S., Srinivas, V., Alekhya, G. & Prakash, B. 2015. Effect of plant growth-promoting *Streptomyces* sp. on growth promotion and grain yield in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Biotech*. 5:799–806. DOI 10.1007/s13205-015-0283-8.
- Grosu, A.I., Siciua, O.A., Dobre, A., Voaides, C. & Cornea, C. 2015. Evaluation of some *Bacillus* spp. Strains for the biocontrol of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* in wheat. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 6: 559-566.
- Gutierrez, M.F.J., Acero, N., Lucas, J.A. & Probanza, A. 1996. The influence of native rhizobacteria on european alder *Alnus glutinosa* (L.) Gaertan growth. II. Characterization of growth promoting and growth inhibiting strains. *Plant Soil*. 182: 67-74.
- Gwyn, A.B. 2006. Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. *Plant AssocBact*. 1-56.
- He, Y.K., Xue, W.X., Sun, Y.D., Yu, X.H. & Liu, P.L. 2000. Leafy head formation of the progenies of transgenic plants of Chinese cabbage with exogenous auxin genes. *Cell Res*. 10: 151–602.
- Hentrich, M., Boettcher, C. & Duchting, P. 2013. The jasmonic acid signaling pathway is linked to auxin homeostasis through the modulation of YUCCA8 and YUCCA9 gene expression'. *Plant J*. 74: 626–637.
- Hernández-López, V.M., Vargas-Vázquez, M.L.P., Muruaga-Martínez, J.S., Hernández-Delgado, S. & Mayek-Pérez, N. 2013. Origen, domesticación y diversificación del frijol común. Avances y perspectivas. *Rev. Fitotec. Mex*. 36 (2): 95 – 104.
- Higa, T. & Wididana, G.N. 1991. The concept and theories of effective microorganisms. p. 118-124. In Parr, S.B. Hornick, and C.E. Whitman (ed.) Proceedings of the First International Conference on Kyusei Nature Farming. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C., USA.
- Higa, T. 1991. Effective Microorganisms: A biotechnology for mankind in Proceedings of the First International Conference on Kyusei Nature Farming,

- Parr, J.F., Hornick, S.B. and Whitman, C. E. (ed), US Dept. of Agriculture, Washington D.C., USA, pp 8-14.
- Higa, T. 2004. La Tecnología de los Microorganismos-efectivos “EM “. Conferencia dictada por el Profesor Teruo Higa en el Real Colegio de Agricultura. Cirencester, Inglaterra.
- Hussain, M.I., Asghar, H.N., Arshad, M. & Shahbaz, M. 2013. Screening of multi-traits Rhizobacteria to improve maize growth under axenic conditions. *The Journal of Animal and Plant Sciences*. 23 (2): 514-520.
- Ignatova, L., Brazhnikova, Y., Berzhanova, R. & Mukasheva, T. 2015. The effect of application of micromycetes on plant growth, as well as soybean and barley yields. *Acta Biochimica Polonica*. 62 (4): 669-675).
- International Seed Testing Association (ISTA). 2010. International rules for seed testing, Seed vigor testing. Chapter 15: 1–57.
- Islam, S., Akanda, A.M., Prova, A., Islam, M.T. & Hossain, M.M. 2016. Isolation and Identification of Plant Growth Promoting Rhizobacteria from Cucumber Rhizosphere and Their Effect on Plant Growth Promotion and Disease Suppression. *Front. Microbiol.* 6 (1360): 1-12. doi: 10.3389/fmicb.2015.0136.
- Jamil, M., Zeb, S., Anees, M., Roohi, A., Ahmed, I., Rehman, S. & Rha, E.S. 2014. Role of *Bacillus licheniformes*. Phytoremediation of Nickel Contaminated Soil Cultivated with Rice. *International Journal of Phytoremediation*. 16(6): 554-571.
- Karadeniz, A., Topcuoglu S.F. & Inan, S. 2006. Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnol.* 22: 1061–1064.
- Kennedy, L.R., Pereg-Gerk, C., Wood, R., Deaker, K., Gilchrist, K., Katupitya, S. 1997. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: facilitating the evolution of an effective association between *Azospirillum* and wheat. *Plant Soil*. 194: 65-79.
- Khan, B.M., Kabir, M.A., Hossain, M.K. and Mridha, M.A.U. 2015. Microbial inoculant influences the germination and growth of *Albizia lebbeck* seedlings in the nursery. *Banko Janakari*. 26 (1): 82-89.
- Khatab, O.H., Nasib, M.A.A., Ghoneimy, E.A., Abo-Elnasr, A.A., Hassan, H.A-A, Hassan, M.Y.A. & Attitalla, I.H. 2015. Role of Microorganisms in our life's as ecofriendly and replacement for chemical methods. *Int. J. Pharm. Life Sci.*, 6(2):4221-4229.

- Kloepper, J.W., Lifshitz, R., Zablutowicz, R.M. 1989. Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnol.* 7 (2): 39-44.
- Lambrecht, M., Okon, Y., VandeBroek, A. & Vanderleyden, J. 2000. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends Microbiol.* 8: 298-300.
- Latour, X., Carberand, T., Lagurre, G., Alland, F., Lemanceu, P. 1996. The composition of fluorescent *Pseudomonas* population associated with roots is influenced by plant and soil type. *Appl Environ Microbiol.* 62: 2449-2456.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R. 1951. Protein measurement the Folinphenol reagent. *J Biol Chem.* 93: 265-275.
- Mahadevamurthy, M., Channappa, T.M., Sidappa, M., Raghupathi, M.S. & Nagaraj, A.K. 2016. Isolation of phosphate solubilizing fungi from rhizosphere soil and its effect on seed growth parameters of different crop plants. *Journal of Applied Biology and Biotechnology.* 4 (6): 22-26.
- Martínez, E., Cantillo, T. & García, D. 2014. Hongos asociados a semillas de *Phaseolus vulgaris* L. cultivadas en Cuba. *Biotecnología Vegetal.* 14 (2): 99 – 105.
- Martínez-Viera, R. & Dibut-Álvarez, B. 2012. Biofertilizantes bacterianos. Editorial Científico-Técnica, La Habana, ISBN 978-959-05-0659-8.
- Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- Miransaria, M. & Smith, D.L. 2014. Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany.* 99: 110 – 121. Disponible en: <http://www.elsevier.com/locate/envexpbot>.
- Mohammed, A., Gebreselassie, W. & Nardos, T. 2013. Effect of Effective Microorganisms (EM) Seed Treatment and Types of Potting Mix on the Emergence and Growth of Coffee (*Coffea arabica* L.) Seedlings. *International Journal of Agricultural Research.* 8: 34-41.
- Mohd, Din, A.R.J., Hanapi, S.Z., Supari, N., Alam, S.A.M., Javed, M.A., Tin, L.C. & Sarmidi, M.R. 2014. Germination, Seedling Growth, Amylase and Protease Activities in Malaysian Upland Rice Seed under Microbial Inoculation Condition. *Journal of Pure and Applied Microbiology.* 8(4): 2627-2635.
- Mohite, B. 2013. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition.* 13(3): 638-649.

- Nerey, Y., Pannecoucque, J., Hernández, H.P., Díaz, M., Espinosa, R., De Vos, E., Van Beneden, S., Herrera, L. y Höfte, M. 2010. *Rhizoctonia* spp. causing root and hypocotyl rot in *Phaseolus vulgaris* in Cuba. *Journal of Phytopathology*. 158: 236-243.
- Nghia, N.K., Tien, T.T.M., Oanh, N.T.K. and Nuong, N.H.K. 2017. Isolation and Characterization of Indole Acetic Acid Producing Halophilic Bacteria from Salt Affected Soil of Rice–Shrimp Farming System in the Mekong Delta, Vietnam. *Agriculture, Forestry and Fisheries*. 6 (3): 69-77. doi: 10.11648/j.aff.20170603.11
- Ni, Di-an, Yu, Xiao-hong, Wang, Ling-jian, Xu, Zhi-hong, 2002. Aberrant development of pollen in transgenic tobacco expressing bacterial *iaaM* gene driven by pollen and tapetum-specific promoters. *Acta Exp Sinica*. 35: 1–6.
- Nogueira, V., Klug, A., Tillmann, M.A.A., Bittencourt, A. & Braga, L.O. 2014. Physiological performance of rice seeds treated with thiamethoxam or rhizobacteria under different temperatures. *Journal of Seed Science*, 36(2): 186-193.
- Nonogaki, H., Bassel, G.W. and Bewley, J.D. 2010. Germination - still a mystery. *Plant Sci*. 179: 574–81.
- Olle, M. 2015. Influence of Effective Microorganisms on the growth and nitrate content of vegetable transplants. *Journal of Advanced Agricultural Technologies*. 2 (1): 25-28. Doi: 10.12720/joaat.2.1.25-28.
- Papa, R. and Gepts, P.L. 2003. Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica. *Theor. Appl. Genet*. 106:239-250.
- Pawar, V.A., Pawar, P.R., Bhosale, A.M. and Chavan, S.V. 2014. Effect of Rhizobium on Seed Germination and Growth of Plants. *Journal of Academia and Industrial Research (JAIR)*. 3 (4): 84-88.
- Peña-Borrego, M.D., de Zayas-Pérez, M.R., & Rodríguez-Fernández, R.M. 2015. La producción científica sobre biofertilizantes en Cuba en el período 2008-2012: un análisis bibliométrico de las revistas cubanas. *Cultivos Tropicales*. 36(1): 44-54.
- Pérez-Montano, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R.A., del Cerro, P., Espuny, M.R., Jiménez-Guerrero, I., López-Baena, F.J., Ollero, F.J. & Cubo, T. 2014. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiol Res*. 169: 325–336.

- Procedimiento Normalizado de Operación. 2014. Metodología para realizar el control de calidad microbiológico en el inóculo sólido. PNO: LB-M-008. Laboratorio de Biotecnología. EEPF Indio Hatuey. Universidad de Matanzas.
- Qin, S., Zhou, W., Li, Z. & Lyu, D. 2016. Effects of rhizobacteria on the respiration and growth of *Cerasus sachalinensis* Kom. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 14 (2):1-13.
- Rajjou, L., Duval, M., Gallardo, K., Catusse, J., Bally, J. and Job, C. and Job, D. 2012. Seed Germination and Vigor. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63:507-533.
- Ramírez, M., Roveda, G., Bonilla, R., Cabra, L., Peñaranda, A. & López, M. 2008. Uso de Microorganismos con potencial como Biofertilizantes en el Cultivo de Mora, 1ª Ed. Editorial Produmedios, Bogotá, Colombia. p. 34-35.
- Rana, A., Kabi, S.R., Verma, S., Adak, A., Pal, M., Shivay, S.Y., Prasanna, R. and Nain, L. 2015. Prospecting plant growth promoting bacteria and cyanobacteria as options for enrichment of macro- and micronutrients in grains in rice–wheat cropping sequence. *Cogent Food & Agriculture*. 1: 1-16. <http://dx.doi.org/10.1080/23311932.2015.1037379>.
- Renwick, A., Campbell, R. and Coc, S. 1991. Assessment of *in vivo* screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathol.* 40 (4): 524-532.
- Romero, I. 2006. Diversidad y función de las Pirofosfatasa de Bacterias Fotosintéticas Púrpura No Sulfurosas. XXVI Congreso Nacional. Sociedad Mexicana de Bioquímica. Vía on line: <http://www.smb.org.mx/XXVICONGRESO/text/ResumenInvitados/IrmaRomero> Consulta: marzo de 2017.
- Saintmartin, R. 2007. Microorganismos efectivos EM, Que son. [En Línea] Disponible en: <http://www.emyucatan.com> Consulta realizada el 21 de diciembre del 2009.
- Salgado, D. 2007. Tecnologías para la utilización de los EM en la producción ganadera. Ecotecnologías. Venezuela.
- Sang, H.J., Gururani, M.A. and Chun, Se-Chul, Chun. 2014. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological Research*. 169: 83-98.
- Santner, A., Calderon-Villalobos L. & Estelle M. 2009. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chem. Biol.* 5: 301-307.

- Saxena, J., Rawat, J. & Sanwal, P. 2016. Enhancement of Growth and Yield of Glycine Max Plants with Inoculation of Phosphate Solubilizing Fungus *Aspergillus Niger* K7 and Biochar Amendment in Soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. DOI: 10.1080/00103624.2016.1243708.
- Schlatter, D., Fubuh, A., Xiao, K., Hernandez, D., Hobbie, S. & Kinkel, L. 2009. Resource Amendments Influence Density and Competitive Phenotypes of *Streptomyces* in Soil. *Microbial Ecology*. 57:413-420.
- Sharon, J.A., Hathwaik, L.T., Glenn, G.M., Imam, S.H. & Lee, C.C. 2016. Isolation of efficient phosphate solubilizing bacteria capable of enhancing tomato plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 16 (2): 525-536.
- Sigarroa, A. 1985. *Biometría y diseño experimental*. Editorial Pueblo y Educación, 733 p.
- Singh, S.P., Singh, H.B., Singh, D.K. & Rakshit, A. 2014. Trichoderma-mediated enhancement of nutrient uptake and reduction in incidence of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Egyptian Journal of Biology*. 16: 29 – 38.
- Ström, K. 2005. Fungal Inhibitory lactic Acid Bacteria. (Doctoral Thesis on Agricultural Sciences). Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences. Swedish University. Uppsala.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2006. *Plant Physiology*, 4th Ed. Sinauer, Sunderland, M. A. 660 p.
- Thakur, D., Kaur, M. & Mishra, A. 2017. Isolation and screening of plant growth promoting *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. and their effect on growth, rhizospheric population and phosphorous concentration of *Aloe vera*. *Journal of Medicinal Plants Studies*. 5(1): 187-192.
- Torres, A.R., Cursino, L., Muro-Abad, J.I., Gomes, E.A., Araujo, E.F., Hungria, M. & Alves, S.T. 2009. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from the state of Minas gerais, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40: 852–856.
- Tsavkelova, E.A., Klimova, S.Y., Cherdyntseva, T.A. & Netrusov, A.I. 2006. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 42: 133-143.
- Ullah, F., Bano, A. & Nosheen, A. 2012. Effects of plant growth regulators on growth and oil quality of canola (*Brassica napus* L.) under drought stress. *Journal of Botany*, 44: 1873 - 1880.

- Van Loon, L.C. 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119: 243-254.
- Villalobos, A., González, A., Santiago, F., Martínez, J. & Martínez, M.E. 2016. Comportamiento agroproductivo de diferentes variedades de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) en la finca «Las María» del municipio primero de enero. *Universidad & Ciencia.* 5 (2): 52-78.
- Visser, R., Holzapfel, W., Bezuidenhout, J. & Kotzé, J. 1986. Antagonism of Lactic Acid Bacteria Against Phytopathogenic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology.* 52(3):552-555.
- Wilson, K.A. 1986. Role of proteolytic enzymes in the mobilization of protein reserves in germinating dicot seeds. In: Dalling, M.J. (Ed.), *Plant Proteolic Enzymes*, Vol. II. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, pp. 20–47.
- Woodward, D. 2003. Soil and Sustainability Effective Microorganism as Regenerative Systems in Earth Healing. Disponible en: <http://p2pays.net/compost/CompostTea/SoilandSustainability.pdf>. Consulta: febrero de 2018.
- Yousefi, S., Kartoolinejad, D., Bahmani, M. & Naghdi, R. 2017. Salinity tolerance of *Dodonaea viscosa* L. inoculated with plant growth-promoting rhizobacteria: assessed based on seed germination and seedling growth characteristics. *Folia Oecologica.* 44: 20–27.
- Zahir Z.A, Arshad, M. & Frankenberger, W.T. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. *Adv. Agron.* 81: 97-168.
- Zhou, Q., Li, K., Jun, X. & Bo, L. 2009. Role and functions of beneficial microorganisms in sustainable aquaculture. *Bioresource Technology.* 100: 3780-3786.