



**UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
CARRERA DE AGROPECUARIA**

**SCREENING DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE
CRECIMIENTO VEGETAL, EN EL DESARROLLO DEL
CULTIVO DE MAIZ (*Zea mays*)**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Requisito parcial para la obtención del título de:

INGENIERA AGROPECUARIA

Autor: Allison Lisbeth Muyudumbay Macias

LA LIBERTAD, JULIO 2024



**UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
CARRERA DE AGROPECUARIA**

**SCREENING DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE
CRECIMIENTO VEGETAL, EN EL DESARROLLO DEL
CULTIVO DE MAIZ (*Zea mays*)**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Requisito parcial para la obtención del título de:

INGENIERA AGROPECUARIA

Autora: Allison Lisbeth Muyudumbay Macias

Tutor: Blgo. Javier Soto Valenzuela, Ph. D.

LA LIBERTAD, 2024

TRIBUNAL DE GRADO

Trabajo de Integración Curricular presentado por **ALLISON LISBETH MUYUDUMBAY MACIAS** como requisito parcial para la obtención del grado de Ingeniero/a Agropecuario de la Carrera de Agropecuaria.

Trabajo de Integración Curricular **APROBADO** el: 17/ Julio/ 2024



Firmado electrónicamente por:
**NADIA ROSAURA
QUEVEDO PINOS**

Ing. Nadia Quevedo Pinos, Ph.D.
**DIRECTORA DE CARRERA
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**



Firmado electrónicamente por:
**CARLOS ELOY
BALMASEDA ESPINOSA**

Ing. Carlos Balmaseda Espinosa, Ph.D.
**PROFESOR ESPECIALISTA
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



Firmado electrónicamente por:
**JAVIER OSWALDO SOTO
VALENZUELA**

Blgo. Javier Soto Valenzuela, Ph.D.
**PROFESOR TUTOR
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



Firmado electrónicamente por:
**NADIA ROSAURA
QUEVEDO PINOS**

Ing. Nadia Quevedo Pinos, Ph.D.
**PROFESORA GUÍA DE LA UIC
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



Firmado electrónicamente por:
**WASHINGTON VIDAL
PERERO VERA**

Ing. Washington Perero Vera, Mgtr.
**ASISTENTE ADMINISTRATIVO
SECRETARIO**

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a mi Dios por darme las fuerzas, el ánimo y los recursos necesarios para avanzar, porque cuando pensé que no podía, puso a las personas indicadas para levantarme y poder culminar esta etapa de mi vida. A mis padres, porque siempre consideraron brindarme el soporte afectivo, material y económico para cumplir mis objetivos académicos y personales.

A mi tutor y a su querida esposa, por el apoyo y los consejos compartidos los cuales fueron fundamentales para la elaboración de este trabajo, sin ellos no habría podido entender que una investigación no solo se trata de intelecto sino de disciplina y perseverancia. Resulta importante reconocer a la Ing. Nadia Quevedo, quien me dio su tiempo y cooperación para cumplir con el proceso de esta investigación. Así mismo agradezco a cada uno de los docentes quienes transfirieron sus conocimientos y valores a lo largo de este recorrido universitario.

Y en forma especial, doy gracias a Dios por haberme permitido coincidir dentro de esta cruzada preuniversitaria, con el que ahora es mi amigo, confidente y futuro compañero de vida, el Ing. Oswaldo Barzola, quien desde el inicio de esta carrera ha procurado considerarme con su tiempo, amor, paciencia y bondad, sin duda alguna este trabajo final no hubiese sido posible sin su ayuda.

A todos los mencionados mis más sinceros agradecimientos. *Recordemos que la investigación es una tarea en equipo* (Daniel Cassany, 2012).

DEDICATORIA

A mi Dios, el principal, el que me da aun lo más importante que es la vida, salud y amor para seguir adelante.

A mis padres la Sra. Ángela Macías y el Sr. Carlos Rengel, por su atención y compromiso de ayudarme en amor a dar cada paso que doy.

A Heiddy Rengel Macías mi querida hermanita, por motivarme a seguir, y ser esa compañera de desvelos y despertador al mismo tiempo; y a Carlos Rengel Macias mi segundo querido hermanito, les dedico cada meta lograda, esperando puedan ser una fuente de inspiración a lo largo de esta carrera de la vida.

Y a mi amado Oswaldo Barzola, por ser esa ayuda incondicional y aliento en las veces que quise rendirme.

Por y para ellos todo mi esfuerzo y dedicación.

RESUMEN

A partir de la modernización del sistema agrícola, el modelo de producción se desarrolla bajo el uso de agroquímicos, con el fin de acelerar e incrementar el rendimiento en los cultivos; sin embargo, cada año aumentan las cantidades de químicos por aplicar, lo que nos lleva en la actualidad a afrontar una crisis mundial debido a los efectos adversos que estos producen a nivel ambiental, salud y económico, por ello es preciso desarrollar alternativas amigables que permitan mejorar la productividad de los cultivos y consecuentemente mejorar la estabilidad de los ecosistemas a largo plazo. El uso de inoculantes formulados a base de Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPR) en cultivos de interés agrícola, representan una alternativa sostenible al uso de químicos en la agricultura. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de 7 cepas bacterianas aisladas a partir de la rizosfera de cultivares provenientes de zonas productoras de la Península de Santa Elena, previamente identificadas como posibles (PGPR), en las etapas de germinación y desarrollo vegetativo del cultivo de maíz (*Zea mays*), el experimento se estableció en condiciones *in vitro* y de vivero. Los mejores resultados se obtuvieron con los tratamientos T3 (T/C 10^{-2}), T5 (KG/M 10^{-4}) y T1(T/C 10^{-4}), quienes superaron los valores obtenidos en el tratamiento comercial (New Giberned). Por lo cual este estudio sugiere el potencial de estos microorganismos para realizar futuras fases de identificación y experimentación en otros cultivos de interés agrícola, para la concepción de un nuevo biofertilizante.

Palabras claves: PGPR. Fertilizantes. Maíz.

ABSTRACT

With the modernization of the agricultural system, the production model has developed under the use of agrochemicals to accelerate and increase crop yields. However, the quantities of chemicals applied have increased each year, leading us to face a global crisis today due to the adverse effects these chemicals have on the environment, health, and economy. Therefore, it is necessary to develop environmentally friendly alternatives that can improve crop productivity and, consequently, enhance the long-term stability of ecosystems. The use of inoculants formulated with Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) in crops of agricultural interest represents a sustainable alternative to the use of chemicals in agriculture. The objective of this research was to evaluate the effect of 7 bacterial strains isolated from the rhizosphere of cultivars from the production areas of the Santa Elena Peninsula, previously identified as potential PGPR, on the germination and vegetative development stages of maize (*Zea mays*). The experiment was conducted under *in vitro* and nursery conditions. The best results were obtained with treatments T3 (T/C 10^{-2}), T5 (KG/M 10^{-4}) y T1(T/C 10^{-4}), which outperformed the values obtained with the commercial treatment (New Giberned). Therefore, this study suggests the potential of these microorganisms for future phases of identification and experimentation in other crops of agricultural interest, aiming to develop a new biofertilizer.

Keywords: PGPR, fertilizers, Maize

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

El presente Trabajo de Integración Curricular titulado “**SCREENING DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL, EN EL DESARROLLO DEL CULTIVO DE MAIZ (ZEA MAYS)**” y elaborado por **Allison Lisbeth Muyudumbay Macias**, declara que la concepción, análisis y resultados son originales y aportan a la actividad científica educativa agropecuaria.

Transferencia de derechos autorales.

"El contenido del presente Trabajo de Graduación es de mi responsabilidad; el patrimonio intelectual del mismo pertenece a la Universidad Estatal Península de Santa Elena".

 Firmado electrónicamente por:
**ALLISON LISBETH
MUYUDUMBAY
MACIAS**

Firma del estudiante

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Problema Científico.....	3
Justificación	3
Objetivos	3
Objetivo General:	3
Objetivos Específicos:	3
Hipótesis.....	4
CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
1.1 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.....	5
1.1.1 Definición	5
1.1.2 Características de una PGPR ideal.....	5
1.1.3 Mecanismos de acción	6
1.1.4 E de las PGPR sobre las plantas.....	6
1.1.5 Aspectos importantes en la inoculación de PGPR.....	7
1.2 Maíz (Zea mays).....	8
1.2.1 Distribución e importancia	8
1.2.2 Fases fenológicas del cultivo	9
1.2.3 Características botánicas.....	9
1.2.4 Importancia de la conductividad estomática	10
1.3 New Gibbered	10
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1 Caracterización del área.....	11
2.2 Materiales, equipos y reactivos.....	11
2.2.1 Material biológico	11
2.2.2 Material y equipos laboratorio.....	12
2.2.3 Reactivos para medios de cultivo.....	12
2.2.4 Materiales didácticos	2
2.3 Tipo de investigación	2
2.4 Diseño de investigación	2
2.4.1 Diseño experimental	2
2.5 Manejo del experimento	14
2.5.1 Etapa- In vitro.....	14
2.5.2 Etapa-Vivero.....	15
2.6 Parámetros evaluados	16
2.6.1 Prueba de germinación y emergencia (In vitro).....	16
2.6.2 Análisis de desarrollo (Vivero).....	16
2.7 Análisis estadístico de los resultados	18
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
3.1 Pruebas de germinación y emergencia (in vitro).....	19

3.1.1	Porcentaje de germinación	19
3.1.2	Crecimiento in vitro (Longitud y diámetro de brote)	20
3.2	Análisis de crecimiento y desarrollo (Vivero).....	21
3.2.1	Frecuencia estomática	21
3.2.2	Parámetros de crecimiento a los 30 DDT.....	22
3.2.3	Porcentaje del peso fresco y seco de la parte aérea y radicular.....	24
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		26
Conclusiones		26
Recomendaciones		26
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		28
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fases fenológicas del maíz.....	9
Tabla 2. Características agronómicas del material de siembra.....	12
Tabla 3. Descripción de los tratamientos	2
Tabla 4. Efecto de la inoculación de rizobacterias en el porcentaje de germinación de semillas de maíz (<i>Zea mays</i>) híbrido- Azor	19
Tabla 5. Efectos de la inoculación de rizobacterias en la longitud y diámetro de brote.....	20
Tabla 6. Peso fresco y seco de la parte aérea y radicular del cultivo de maíz (<i>Zea mays</i>), evaluado a los 30 DDT.....	24
Tabla 7. Resumen de medias obtenidas en el crecimiento del cultivo de maíz (<i>Zea mays</i>) a los 30 DDT	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización del área de investigación (google earth, 2024).....	11
Figura 2. Comparación de variables de crecimiento <i>in vitro</i> en semillas de maíz	21
Figura 3. Número de estomas en hojas de maíz (<i>zea mays</i>) bajo prueba de inoculantes rizosféricos (posibles pgpr). medias con una letra común no son significativamente diferentes.....	22
Figura 4. Longitud (a); diámetro (b); número de hojas(c); longitud de raíz (d) de plantas de maíz (<i>zea mays</i>), bajo prueba de inoculantes rizosféricos (posibles pgpr) evaluados a los 30 ddt. medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).....	23

ÍNDICE DE ANEXOS

Figura 1A.Desarrollo del ensayo

Figura 2A.Prueba de germinación y emergencia de semillas de maíz (*zea mays*), evaluadas a los 8 días, bajo inoculantes rizosféricos (posibles pgpr) comparados con agua destilada y producto comercial

Figura 3A.Toma de datos de la prueba de germinación y emergencia (etapa *in vitro*)

Figura 4A.Evaluación de crecimiento y desarrollo del cultivo de maíz bajo diferentes inoculantes bacterianos como posibles pgpr en comparación con agua destilada y producto comercial (etapa vivero)

Figura 5A.Toma de datos- variables de desarrollo vegetativo

Tabla 1A. Análisis de varianza para las variables de germinación y emergencia en semillas de maíz evaluada a los 8 días luego de la primera inoculación bacteriana

tabla 2A.Medias de las variables evaluadas en el proceso de germinación y emergencia de semillas de maíz

Tabla 3A. Análisis de varianza de las variables de desarrollo del cultivo de maíz a los 30 días posterior a la siembra.

Tabla 4A.Análisis de varianza para la variable frecuencia estomática en hojas de maíz bajo inoculación bacteriana

INTRODUCCIÓN

El uso de abonos orgánicos tiene una larga historia en la agricultura, incluyendo los primeros intentos del hombre por mejorar el crecimiento de las plantas. Sin embargo, la teoría de la nutrición mineral de Von Liebig en el siglo XIX sugirió que los abonos orgánicos podían ser sustituidos por fertilizantes minerales, lo cual revolucionó la agricultura. Con el tiempo, el excesivo uso de fertilizantes inorgánicos y malas prácticas agrícolas ocasionaron efectos negativos en la agricultura y los ecosistemas (Varela, 2007).

La práctica del cultivo intensivo de granos, hortalizas y otros cultivos ha llevado a la sobreexplotación de ciertos suelos mediante técnicas como los monocultivos y el pastoreo excesivo. Estas prácticas han disminuido la fertilidad del suelo, causando salinización y agotamiento de los mantos acuíferos en las áreas de riego. Por consecuencia se crea una dependencia en el uso de insumos agrícolas como fertilizantes y plaguicidas, para lograr suplir los requerimientos del cultivo, provocando a corto y largo plazo contaminación, disminución en la diversidad genética de los cultivos y aumento de las plagas y enfermedades (Cipriano et al., 2012).

Globalmente, se utilizan por año más de 100 millones de toneladas de fertilizantes nitrogenados y más de 90 millones de potasio y fósforo para obtener altos rendimientos en la producción de cultivos, pronosticando un incremento de hasta el 70% para el 2050 (FAO, 2018).

El suelo, base de los recursos agrícolas, es un entorno complejo y frágil. Su recuperación y mantenimiento sostenible son cruciales para la producción agropecuaria global. Por tal motivo es necesaria la aplicación de prácticas agrícolas más sostenibles que integren fertilizantes orgánicos y minerales, junto con otras estrategias de manejo para reducir el impacto ambiental. La biotecnología es capaz de proporcionar herramientas que aprovechan los servicios de los organismos del suelo para mantener su fertilidad y productividad, promoviendo prácticas agrícolas más sostenibles (Puente et al., 2007).

Una forma de mitigar el impacto negativo evidente en el sector agrícola, es mediante la aplicación de biofertilizantes microbianos (virus, bacterias, hongos y nematodos) que interactúen con las plantas. En el ámbito de la sostenibilidad, la investigación de nuevos microorganismos que promuevan el crecimiento vegetal se está volviendo cada vez más relevante; que pueden, en algunas circunstancias, sustituir parcialmente el uso de pesticidas y fertilizantes químicos (Cipriano, 2012).

Dentro de este grupo de microorganismos que proporcionan efectos benéficos en las plantas, se encuentran aquel tipo de bacterias que Kloepper en 1992 definió como rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal o PGPR (siglas en inglés) las cuales demostraron ser organismos altamente eficientes que, a través de diversos mecanismos de acción, mejoran significativamente el crecimiento y rendimiento de las plantas (Hernández et al., 2003).

Se han realizado diferentes investigaciones que confirman la posibilidad de sustituir parcialmente los insumos agrícolas inorgánicos mediante el uso de estos agentes microbianos. Los géneros más evaluados son *Azospirillum* spp. (Cool, 2010); *Pseudomonas fluorescens* (Ramamoorthy et al., 2010); *Stenotrophomonas*, *Azotobacter* y *Pseudomonas* (Florez et al., 2017). *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Enterobacter* (Pérez et al., 2021); *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Rhizobium* (Reyes et al., 2008); *Bacillus* spp. (Acurio et al., 2020), entre otras; que permiten inferir sobre las principales áreas de acción de estos microorganismos para mejorar la salud y producción de cultivos, así como promover la sostenibilidad ambiental.

Por otro lado, Pérez et al. (2021) manifiestan que el resultado de la inoculación también depende de la procedencia del aislado por lo que, el empleo de cepas nativas como inoculantes promueve un mejor manejo ecológico y sostenible de los agroecosistemas y producción agrícola. Gracias a la capacidad para interactuar de manera positiva con la microbiota nativa del suelo y su adaptación a las condiciones climáticas y agroecológicas locales, obtienen mejor rendimiento que las cepas foráneas.

En la provincia de Santa Elena se han inoculado y evaluado el efecto de tres cepas de rizobios nativos en los híbridos de maíz AGRI 104 y 201 a nivel de laboratorio y campo; con porcentajes de germinación y peso fresco igual y superior al testigo, lo cual demostró la incidencia de la inoculación con rizobacterias en el cultivo en las primeras etapas fenológicas del cultivo (Soto-Valenzuela et al., 2016).

Por tal motivo, este trabajo evalúa el efecto de 7 cepas nativas identificadas como posibles PGPR por el por el Centro de Investigaciones Biotecnológicas (CEB) de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE), sobre la germinación y desarrollo vegetativo (V4) del cultivo de maíz (*Zea mays*) variedad Azor . Los tratamientos fueron comparados con el producto comercial New Giberned y agua destilada como testigos.

Problema Científico

¿Qué efectos tendrán los aislados bacterianos considerados como posibles PGPR en la germinación y desarrollo vegetativo del cultivo de maíz?

Justificación

Los fertilizantes representan un alto costo monetario, se estima que solo la fertilización nitrogenada en el cultivo de maíz representa un 40% del costo total de producción. Además, de que estos, como anteriormente se mencionó tienen un alto potencial contaminante, con graves consecuencias para el medio ambiente, y su fabricación requiere grandes cantidades de petróleo. Al aplicarse al suelo, los fertilizantes químicos suelen perderse por lixiviación y volatilización, causando efectos adversos al medio ambiente. Con base a esto es preciso desarrollar alternativas amigables que permitan mejorar la productividad de los cultivos y consecuentemente la estabilidad de los ecosistemas a largo plazo (Sánchez et al., 2021).

Este estudio busca identificar las cepas bacterianas que favorezcan o estimulen un desarrollo óptimo en el cultivo evaluado, con el propósito de constituir un inoculante potencial para futuras fases de identificación y experimentación en diversos cultivos de interés agrícola y posteriormente la elaboración de un biofertilizante.

Objetivos

Objetivo General:

- ❖ Evaluar el efecto de las bacterias aisladas a partir de la rizosfera de cultivares provenientes de zonas productoras de la Península de Santa Elena, en el desarrollo del cultivo de maíz (*Zea mays*), a nivel *in vitro* y vivero.

Objetivos Específicos:

1. Analizar las características fenológicas del cultivo de maíz inoculados con los posibles aislados PGPRs.
2. Determinar los tratamientos más eficientes para el desarrollo del cultivo de maíz.
3. Recomendar como probables PGPRs a las cepas bacterias con mejor efecto en el cultivo de maíz.

Hipótesis

Al menos uno de los tratamientos mencionados como probables PGPR, evidenciará mayor desarrollo en el cultivo de maíz, en comparación con el producto comercial.

CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal

1.1.1 Definición

Las rizobacterias (PGPR) son un vasto y muy diverso grupo de bacterias de vida libre; a lo largo de los años han sido objeto de estudio debido a su diversidad metabólica, contribuyendo no solo a: (1) potencializar el crecimiento vegetal mejorando la disponibilidad o absorción de minerales y otro tipo de compuestos (nitratos, fosfatos, etc.); (2) estimular la producción de fitohormonas necesarias en el desarrollo (auxinas, giberelinas, etc.); o (3) inducir a la resistencia sistémica de las plantas ante el estrés biótico (ataques de agentes patógenos) y abiótico (sequía, salinidad, temperatura, contaminantes, etc.), sino también por las múltiples posibilidades que tiene tanto de descontaminación de suelos, como de reforestación y recuperación de ecosistemas (Benjumedá, 2017).

Posada et al. (2021) concluyen en una revisión bibliográfica global realizada en un periodo de 1990-2019, que los géneros bacterianos mayormente estudiados son: *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Enterobacter*, debido a que estos poseen rasgos PGPR efectivos como capacidad biocontroladora, solubilización de minerales, síntesis de fitohormonas, además del potencial de conferir resistencia al estrés salino, como es el caso del género *Enterobacter*.

1.1.2 Características de una PGPR ideal

Debido a las controversias e incertidumbres que han surgido en los años recientes con relación a cuándo se considera que una rizobacteria puede ser considerada como PGPR, es que se han establecido ciertas características que definen a este grupo (LABSAF, 2022):

- Debe ser altamente competente en la rizosfera y eco amigable.
- Debe colonizar las raíces de las plantas en cantidades significativas tras la inoculación.
- Debería poder promover el crecimiento de las plantas.
- Debe exhibir un amplio espectro de acción.
- Debe ser compatible con otras bacterias en la rizosfera.
- Debe ser tolerante a factores ambientales como el calor, la desecación, la radiación y otros.

- Debe demostrar mejores habilidades competitivas sobre las comunidades de rizobacterias existentes.
- Por lo general son selectivas.
- Se distinguen por generar mayor mucosidad.

1.1.3 Mecanismos de acción

Las bacterias PGPR poseen diversos mecanismos para iniciar la interacción planta-bacteria, las cuales por modo de acción se clasifican en dos maneras diferentes. (1) de manera directa, las bacterias le proporcionan a la planta compuestos sintetizados por ellas mismas, estimulando así un mejor desarrollo vegetal; mientras que, (2) en el mecanismo de forma indirecta, se basa en que las bacterias producen ciertos metabolitos que al funcionar como antagonicos de microorganismos perjudiciales, hacen que las plantas se desarrollen en un ambiente idóneo libre de fitopatógenos (Muñoz, 2019):

(1) Directos

- Fijación biológica de nitrógeno.
- Solubilización de fosfatos.
- Producción de sideróforos.
- Producción de exopolisacáridos.
- Producción de hormonas.

(2) Indirectos

- Producción de antibióticos.
- Producción de enzimas líticas.
- Síntesis de cianuro de hidrógeno y compuestos orgánicos volátiles.
- Resistencia sistémica inducida.

1.1.4 Antecedentes de las PGPR sobre las plantas

Las Investigaciones realizadas por Molina (2006) y Alexander Cool (2010), referentes a la aplicación de diversos inoculantes del género *Azospirillum* en el maíz, concluyen que especies asociadas a este género se caracterizan por brindar una mejor solubilización de nutrientes y producción de fitohormonas, lo cual deriva a un incremento de la población local, emergencia, desarrollo y rendimiento obtenido en el cultivo. Así mismo se le atribuye a este género como una alternativa económica en el uso de fertilizantes químicos, al evidenciar una reducción del 50% de los costos competentes a la fertilización inorgánica, obteniendo resultados favorables en el rendimiento del cultivo,

superando al rendimiento obtenido por el Programa de Maíz con fertilización inorgánica al 100 %.

A su vez Borbor (2014) en su investigación acota la importancia de la utilización de rizobacterias en la agricultura, debido a los resultados que se han obtenido en múltiples investigaciones con respecto a la tecnología aplicada y al bajo costo de producción en fertilizantes, aclarando que un buen rendimiento y una pronta recuperación del suelo se produce cuando hay una interacción entre bioinoculante y fertilizante.

Criollo et al. (2012) evaluaron el efecto de dos inoculantes bacterianos como *Stenotrophomona* ssp. y *Pseudomona* spp., en el crecimiento del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), bajo condiciones de invernadero; los resultados demostraron la capacidad en producción de biomasa que obtuvieron las cepas evaluadas, logrando superar en más de un 80% al testigo absoluto a los 100 días después de la siembra.

Gómez (2015) bajo un screening inicial evaluó el efecto de aislados bacterianos provenientes de la rizosfera de diversos cultivos en plántulas de arroz, bajo un esquema de biofertilización en condiciones in vitro, de los cuales los resultados mostraron un incremento significativo en las variables evaluadas, lo cual se constituye como una estrategia efectiva para mejorar el desarrollo del cultivo de arroz.

Hernández et al. (2003) indican que la utilización de PGPR ha tenido un impacto considerable en el crecimiento de las plantas, observándose mejoras en la emergencia, el vigor, la biomasa y el desarrollo del sistema radicular. Esto ha resultado en un aumento de hasta el 30 % en la productividad de cultivos de interés comercial, como arroz, soja, maíz, trigo, papa y pimiento, entre otros.

Sin embargo, hay estudios en los que no se obtuvieron significancia en los resultados obtenidos con respecto a la inoculación de PGPR, como Romero (2017) realizó una investigación en donde inoculó semillas de maíz con asociación de promotores de crecimiento vegetal del género *Bradirizobium japonicum*, *Azospirillum brasiliensis*, *Pseudomonas fluorescens* y diferentes fuentes fosfatadas, en donde no obtuvo ningún efecto significativo en las variables evaluadas con respecto a los inoculantes, mientras que las fuentes de fósforo utilizadas si obtuvieron una influencia en altura de planta, número de hojas, masa seca aérea e índice de cosecha.

Hungría (2011) manifiesta que, la ausencia de respuesta a los promotores de crecimiento vegetal podría deberse a las condiciones ambientales durante la realización del

experimento, así como a las características genéticas de la variedad de maíz utilizada. Según, estos factores influyen significativamente en la eficacia del inoculante.

1.1.5 Aspectos importantes en la inoculación de PGPR

A continuación, se presentan varios aspectos importantes en el proceso de inoculación (Hungría, 2011):

- ✓ Se debe procurar una distribución uniforme del inoculante líquido en las semillas.
- ✓ Se debe prestar especial atención en la temperatura a la hora de inocular y escoger el lugar de depósito de semillas, la temperatura no puede ser menor a 27 °C, ni superar los 35 °C.
- ✓ Se debe evitar dejar las semillas expuestas al sol.
- ✓ No se recomienda la inoculación directamente en las bandejas sembradoras, ya que dificulta la cobertura uniforme de las semillas.
- ✓ Sembrar inmediatamente o, como máximo, dentro de las 24 horas posteriores a la inoculación.
- ✓ En el caso de semillas tratadas con fungicidas, insecticidas y/o micronutrientes, el inoculante debe aplicarse al final y la siembra debe realizarse lo antes posible. Si no es posible sembrar en 24 horas, repetir el proceso de inoculación.

Es importante recordar que el inoculante contiene bacterias vivas, sensibles al calor, a la falta de agua y a los agroquímicos. En el caso de que los aislados se expongan a alguna de estas condiciones, es necesario aumentar la dosis del inoculante lo que permitirá obtener una mayor cantidad de células por semilla y posteriormente deberá sembrar lo antes posible.

1.2 Maíz (Zea mays)

1.2.1 Distribución e importancia

Andrade et al. (2023) indican que, la producción mundial de maíz creció de 600 millones de toneladas en el año 2000 a aproximadamente 1150 millones de toneladas en 2020, lo que indica que la producción prácticamente se duplicó en solo dos décadas. Esto debido a un incremento en el área de cultivo, que aumentó en 60 millones de hectáreas y 1,5 toneladas en los rendimientos promedios por hectárea durante ese período.

Caviedes et al. (2023) manifiestan que, el maíz es el cultivo transitorio más importante del Ecuador, logrando contribuir aproximadamente en un 7 % al Valor Agregado Bruto (VAB) Agropecuario. En el 2022 la superficie sembrada fue de 375908

hectáreas de maíz duro seco y 57309 hectáreas de maíz suave, superando ampliamente a otros cultivos relevantes en el país, como arroz, banano, palma aceitera y caña de azúcar, entre otros.

Según la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (2022) la mayor superficie de siembra de maíz duro seco está localizado principalmente en la Región Costa. Las provincias de Los Ríos, Manabí y Guayas concentran el 86,7 % de la superficie total cosechada de este producto.

Diversos elementos destacan la relevancia del maíz: su capacidad para adaptarse a una amplia gama de temperaturas, tipos de suelo y niveles de humedad; es uno de los cultivos más resistentes a enfermedades y plagas; tiene un alto potencial de rendimiento y es empleado tanto en la alimentación animal como humana. (Leonard, 2020).

1.2.2 Fases fenológicas del cultivo

Las fases fenológicas del cultivo se dividen en dos grandes períodos: en este caso solo se abarcará el vegetativo, Esta fase inicia desde la siembra y dura hasta poco antes de que aparezcan las estructuras reproductivas, es decir, cuando se comienza a visualizar la espiga del maíz (flor masculina). Durante la etapa de plántula cualquier daño al follaje o a las raíces es crítico y pone en riesgo la supervivencia de las plántulas. En la fase vegetativa la mayor parte de la energía se dirige a la formación de follaje; por tanto, la planta tiene cierta tolerancia a la pérdida de follaje a causa del ataque de alguna plaga Intagri (2007). Como se muestra en la siguiente Tabla 1:

Tabla 1. Fases fenológicas del maíz

Etapas Vegetativas	Etapas Reproductivas
VE (Emergencia)	R1 (Emergencia de estigmas)
V1 (Primera hoja)	R2 (Cuaje o Ampolla)
V2 (Segunda hoja)	R3 (Grano lechoso)
Vn (Enésima hoja)	R4 (Grano pastoso)
VT (Panojamiento)	R5 (Grano duro o dentado)
	R6 (Madurez fisiológica)

Fuente: Yzarra y López (2000)

1.2.3 Características botánicas

Montoro et al. (2016) indican que el maíz es una planta que presenta las siguientes características:

- Gramínea anual de crecimiento estival con un mecanismo fotosintético C4.
- Planta herbácea que presenta raíces primarias fasciculadas y raíces secundarias o adventicias, cuya función principal es anclar la planta al suelo.
- El tallo es cilíndrico, hueco y articulado, de crecimiento erecto, sin ramificaciones, con un aspecto similar al de una caña.
- Las hojas son largas, lanceoladas y alternas, y están abrazadas al tallo por vainas, con extremos afilados y cortantes.
- Desarrollan inflorescencias masculinas ("panoja") y femeninas ("mazorca"), una característica de las plantas diclino-monoicas.

Trewavas (2003) manifiesta que, entre todos los órganos de la planta la hoja es la más sensible a las condiciones del ambiente, lo que la hace reflejar alteraciones morfológicas debido al estrés. Estos cambios se manifiestan en la síntesis de proteínas, la estructura de la pared celular, el espesor de la cutícula y la conductancia estomática.

1.2.4 Importancia de la conductividad estomática

Alfonso (1996) indica que los estomas son células oclusivas o aberturas que se encuentran en la epidermis de las hojas y tallos jóvenes, estos cumplen un rol importante en el mantenimiento de la homeostasis, debido a que son las encargadas de regular la eficiencia del uso de agua y la fotosíntesis. A través de estas, gran cantidad de agua absorbida se pierde por medio de la transpiración, la cual es influenciada por factores externos e internos. Como resultado, estas células pueden ser determinantes para mejorar la eficacia de la planta y la productividad agrícola.

En el caso del cultivo de maíz se dice que aproximadamente un 98% del agua absorbida es transpirada y tan solo el 2% es utilizada en la fotosíntesis (Alfonso, 1996).

1.3 New Giberbed

Es un regulador de crecimiento vegetal a base de Ácido Giberélico al 10,00% (GA3), actúa estimulando la división y elongación celular, estimula el enraizamiento, acelera la floración y mejora notablemente la calidad de los frutos.

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Caracterización del área

Esta investigación se llevó a cabo en los laboratorios del Centro de Investigaciones Biotecnológicas (CEB) de la Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE) en el cantón La Libertad, vía principal Guayaquil-La Libertad, a 27 km del cantón Santa Elena. Las coordenadas geográficas del sitio corresponden a Latitud: 2° 14' 01"S; Longitud: 80° 52' 33"W; y una altitud de 36 msnm.



Figura 1. Localización del área de investigación (Google Earth, 2024)

2.2 Materiales, equipos y reactivos

2.2.1 Material biológico

2.2.1.1 Inoculante microbiano

el origen de los aislados bacterianos corresponden a la rizosfera de dos variedades de pastos (*Pennisetum purpureum* y *Panicum máximum cv. tanzania*) cultivados en las parroquias de Manglaralto y Colonche; identificados como probables PGPRs por el Centro de Investigaciones Biotecnológicas (CEB)- Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE).

2.2.1.2 Material de siembra

Para esta evaluación se utilizó como material vegetativo el híbrido de maíz AZOR de la marca Advanta, cuyas características agronómicas se detallan a continuación:

Tabla 2. Características agronómicas del material de siembra
Zea mays L. - Híbrido (AZOR)

Tipo de Híbrido	Simple
Germinación mínima	70 - 90%
Altura de Planta (m)	2.50
Tipo de grano	Color amarillo naranja
Días a Floración	50
Días a Cosecha	100- 120
Numero de hilera	16- 18
Resistencia al acame	Muy buena

2.2.2 Material y equipos laboratorio

- Cajas Petri
- Matraz Erlenmeyer 1000 ml
- Tubos de ensayo
- Plato agitador calefactor
- Autoclave
- Incubadora
- Cabina de flujo laminar
- Estufa
- Centrifuga
- Espectrofotómetro
- Balanza digital
- Microscopio
- Calibrador vernier
- Bisturí
- Mechero de Bunsen
- Asa
- Pinzas de disección
- Mandil
- Guantes
- Mascarillas
- Algodón
- Bandejas de plástico
- Papel toalla
- Macetas

2.2.3 Reactivos para medios de cultivo

- Medios de cultivo: Caldo de Lactosa-Peptona (LMC) y Levadura Manitol Agar (LMA)
- Cloruro de bario ($BaCl_2$)
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4)
- Hipoclorito sódico al 5% ($NaClO$)
- Sacarosa
- Alcohol
- Agua destilada

2.2.4 Materiales didácticos

- Cámara fotográfica
- Computador
- Hojas de registro
- Bolígrafos y marcadores

2.3 Tipo de investigación

Este estudio pretende demostrar que la aplicación de los aislados bacterianos considerados como posibles PGPRs podrían ser una estrategia potencial para la inducción al mejoramiento germinativo y evolutivo del cultivo (Benjumeda, 2017), por tal razón se considera que esta investigación es de tipo experimental, siguiendo la sub línea de investigación correspondiente a la Biotecnología Agrícola.

2.4 Diseño de investigación

2.4.1 Diseño experimental

El objetivo del diseño experimental fue evaluar el efecto de las diferentes cepas aisladas en comparación a un producto comercial como alternativa biológica para desarrollar o inhibir el proceso germinativo y fenológico del cultivo de maíz. Este trabajo se dividió en dos etapas (1) *In vitro* y (2) Condiciones de vivero.

2.4.1.1 Inoculación y germinación (*In vitro*)

Se empleó un Diseño Completamente al Azar (DCA); con 9 tratamientos (incluido el testigo) y tres réplicas, en donde se procedió a la inoculación de 50 semillas por repetición dando un total de 150 semillas por tratamiento, correspondiendo cada bandeja germinativa en una unidad experimental, los tratamientos se detallan en la Tabla 2:

Tabla 3. Descripción de los tratamientos

Tratamiento	Aislados
T ₁	T/C 10 ⁻⁴
T ₂	T/C 10 ⁻³
T ₃	T/C 10 ⁻²
T ₄	T/C 10 ⁻⁵
T ₅	KG/M 10 ⁻⁴
T ₆	KG/M 10 ⁻³
T ₇	KG/M 10 ⁻⁵
T ₈	Agua destilada (Testigo absoluto)
T ₉	New Giberned (Testigo químico)

KG: King Grass; T: Tanzania; M: Manglaralto; C: Colonche
Todos los aislados bacterianos o cepas seleccionadas tienen una población de 10⁶cel/ml.

2.4.1.2 *Desarrollo vegetativo (Condiciones de vivero)*

Para evaluar las variables del desarrollo vegetativo también se utilizó un DCA, en donde se trabajó con los mejores tratamientos obtenidos de la fase *in vitro*, con tres repeticiones; los cuales también fueron comparados con el producto comercial New Giberned y el testigo absoluto (agua destilada), la unidad experimental consistió en una maceta cultivada con tres semillas de maíz germinadas.

2.5 Manejo del experimento

2.5.1 *Etapa- In vitro*

Los materiales de laboratorio utilizados en este ensayo fueron previamente esterilizados a 121 °C por 15 minutos y una atmósfera de presión. A continuación, se describirán las actividades realizadas:

2.5.1.1 *Reactivación de cepas bacterianas*

Los aislados fueron reactivados en medio LMA (Levadura Manitol Agar), mediante un estriado simple en una placa Petri, luego las cajas se incubaron a 30 °C por 48 h, transcurrido el tiempo fueron transferidos a un tubo de ensayo con 10 ml de LMC (Caldo de Lactosa-Peptona) realizando tres asadas de cada aislado, posteriormente se procedió a incubar con las mismas condiciones mencionadas, en agitación a 70 rpm.

2.5.1.2 *Determinación del número exponencial de crecimiento bacteriano de las posibles PGPR*

El caldo se sometió a centrifugación a 5000 rpm para concentrar la biomasa celular, transcurrido 24 h se midió la absorbancia obtenida a 500 nm, utilizando LMC como blanco, luego se procedió a la lectura en el espectrofotómetro seguido de una resuspensión en agua destilada estéril hasta llegar a una concentración celular de 10^6 bacterias/ ml^{-1} utilizando la escala de Mac Farland (Fiallos, 2017).

2.5.1.3 *Lavado y desinfección de las semillas*

Las semillas fueron lavadas dos veces con agua destilada, luego desinfectadas con hipoclorito de sodio (NaClO al 5%) por tres minutos y finalmente sumergidas en alcohol al 70% por 2 minutos, realizando un enjuague con agua destilada estéril después de cada solución, para eliminar residuos químicos y otros microorganismos no deseados, con el fin

de garantizar que las semillas se encuentren libres de cualquier contaminante y listas para la fase de inoculación.

2.5.1.4 Inoculación de semillas

Las semillas fueron previamente sumergidas en una solución de glucosa al 25% como adherente, con el fin de que las bacterias logren impregnarse en la superficie o testa, luego se inoculó por inmersión utilizando 9000µl del caldo de cultivo de cepas de acuerdo a los tratamientos durante 5 minutos (Soto et al., 2016). Fueron inoculadas un total de 1350 semillas de maíz.

2.5.1.5 Distribución en bandejas germinadoras

En cada bandeja germinativa se colocó una lámina de papel toalla previamente humedecido con agua destilada estéril, sobre el cual se colocaron las semillas, evitando aglomeraciones y garantizando la uniformidad germinativa de las mismas, posteriormente se almacenaron a 28 °C a oscuridad constante.

Finalmente, a los 7 días después de la primera inoculación, se procedieron a evaluar las semillas de acuerdo a las variables propuesta en esta etapa *in vitro*.

2.5.2 Etapa-Vivero

2.5.2.1 Siembra

Una vez evaluado el proceso germinativo, se seleccionaron 5 tratamientos incluido testigos de la fase *in vitro* considerando la uniformidad de las variables estudiadas, seguidamente se llevó a cabo la siembra, depositando tres semillas germinadas por maceta, con capacidad de 10 kg de sustrato previamente esterilizado a 120 °C durante 15 min y una atmósfera de presión.

2.5.2.2 Raleo

A los 15 días después del trasplante (DDT), se eliminó de cada unidad experimental, las plántulas con menor desarrollo, con el fin de mantener la plántula con mejores características fenológicas (una planta por maceta).

2.5.2.3 Reinoculación

A los 8 días después de la siembra, se realizó una segunda inoculación, agregando 1 ml de suspensión bacteriana (de acuerdo a los tratamientos) sobre cada planta (Soto et al., 2016).

2.5.2.4 Riego

La cantidad hídrica suministrada al cultivo depende del ciclo vegetativo de las plantas (Borbor, 2014). Sin embargo, considerando (1) las condiciones controladas a la que se expuso las semillas y (2) posteriormente la plántula; los riegos se efectuaron cada dos días durante el proceso germinativo y de desarrollo, para evitar encharcamiento.

2.6 Parámetros evaluados

2.6.1 Prueba de germinación y emergencia (*In vitro*)

Porcentaje de germinación

A los 7 días después de la primera inoculación, se evaluó la respuesta germinativa de cada tratamiento mediante la observación, para lo cual el rompimiento de la testa producido por la radícula fue un indicativo clave a la hora de realizar el conteo, luego se calculó el porcentaje de la misma por medio de la siguiente fórmula propuesta por Bewley (1997):

$$PG = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de semillas germinadas (x) } 100}{\text{N}^{\circ} \text{ total de semillas}}$$

Posteriormente, se seleccionó el 10% de las plántulas al azar de cada réplica por tratamiento, con el fin de evaluar las siguientes variables:

Longitud de brote (cm)

Con ayuda de un calibrador vernier, se procedió a medir cada plántula, en base al coleóptilo de la semilla en emergencia, hasta el ápice de la misma.

Diámetro de brote (mm)

Este parámetro fue medido tomando en cuenta el grosor del coleóptilo, mediante el uso de un calibrador vernier.

2.6.2 Análisis de desarrollo (*Vivero*)

Frecuencia estomática

Se procedió a desprender una hoja madura por cada unidad experimental, las cuales fueron trasladadas al laboratorio para cuantificar la frecuencia estomática en ambas caras de los folíolos (Superficie adaxial y abaxial). Las muestras se obtuvieron haciendo un corte directo de la epidermis tomando como referencia de conteo 1 mm²; luego se llevaron a observación bajo un microscopio óptico con el objetivo 10X (Reyes et al., 2015).

Las siguientes variables de desarrollo se evaluaron a los 30 días después de la siembra:

Longitud del tallo (cm)

Medida desde la base del tallo, hasta el ápice de la planta, haciendo uso de un flexómetro.

Diámetro de entrenudo (mm)

Con la ayuda de un calibrador, se procedió a medir a partir del segundo entrenudo de la parte aérea del maíz.

Número de hojas

Por medio de la observación, se tomaron en cuenta todas las hojas formadas completamente.

Peso fresco del material aéreo

Se realizó un corte a la mitad del coleóptilo con la finalidad de separar la parte aérea de la radícula, luego se trasladó el material a una balanza analítica para determinar el peso húmedo, expresado en gramos.

Peso Seco del material aéreo

El material se trasladó a una estufa a 65 °C durante 48 horas.

Longitud de raíz

Con ayuda de un flexómetro, se evaluó la longitud de la zona radical a partir del primer nudo.

Peso fresco de la raíz

Se colocó la parte radicular de la planta previamente lavada, secada y rotulada, en una balanza analítica para la determinación del peso húmedo, expresado en gramos.

Peso seco de la raíz

Se trasladó a una estufa a 65 °C durante 48 horas para la determinación del peso seco en balanza analítica.

Porcentaje de pérdida de agua en raíz

Se calculó mediante la fórmula propuesta por Salvador et al. (2004), descrita a continuación:

$$\%P_{a\acute{e}rea} = (P_F - P_S) \times 100 / P_{inicial}$$

Porcentaje de pérdida de agua en parte aérea

Se calculó mediante la fórmula propuesta por Salvador et al. (2004), descrita a continuación:

$$\%P_{radicular} = (P_F - P_S) \times 100 / P_{inicial}$$

2.7 Análisis estadístico de los resultados

Los datos obtenidos fueron expuestos a un análisis de varianza con el test F en el software InfoStat (2020), en el cual se establecieron los efectos diferenciales entre cada tratamiento, realizando una prueba de Duncan en un margen de probabilidad de error < 0,05.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Pruebas de germinación y emergencia (in vitro)

3.1.1 Porcentaje de germinación

Bajo las condiciones de este experimento mediante el test de Duncan con un alfa de 0,05 los tratamientos no son significativamente diferentes entre sí, sin embargo, si hay evidencia de una diferencia numérica entre el T3 (T/C 10^{-2}) que obtuvo un 86% de semillas germinadas en comparación al T7 (KG/M 10^{-5}) el cual solo obtuvo 51% de emergencia; A pesar de no obtener un respaldo estadístico, es válido mencionar que el T3 aumentó el porcentaje de germinación de las semillas de maíz con respecto a los testigos en un 17 (T9) y 20% (T8). Los resultados de porcentaje de germinación se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Efecto de la inoculación de rizobacterias en el porcentaje de germinación de semillas de maíz (*Zea mays*) híbrido- Azor

Tratamientos	N	1-2 días	3-7 días	8-9 días	SE	SG	TSG	Porcentaje (%)
T1 (T/C 10^{-4})	150	45	55	20	20	10	120	80 a
T2 (T/C 10^{-3})	150	47	54	12	14	23	113	75 a
T3 (T/C 10^{-2})	150	52	62	15	10	11	129	86 a
T4 (T/C 10^{-5})	150	36	57	15	18	24	108	72 a
T5 (KG/M 10^{-4})	150	44	55	23	11	17	122	81 a
T6 (KG/M 10^{-3})	150	13	69	14	17	37	96	64 a
T7 (KG/M 10^{-5})	150	21	45	10	8	66	76	51 a
T8 (Agua destilada)	150	45	42	16	27	20	103	69 a
T9 (New Giberned)	150	50	37	20	25	18	107	71 a
Total	135	353	476	145	150	226	974	72 %

KG: King Grass; M: Manglaralto; T: Tanzania; C: Colonche; TSG: Total de semillas germinadas; SG: Sin germinar; SE: Semillas enfermas; N: Número de semillas inoculadas.
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

El efecto promotor de los aislados bacterianos sobre la germinación, puede estar estrechamente relacionado con la producción de fitohormonas. Bewley (1997) indica que las bacterias rizosféricas cumplen un rol importante en la germinación y desarrollo vegetal, puesto que son capaces de sintetizar y excretar hormonas (citoquininas, auxinas, giberelinas etc.) que intervienen en el aumento de la extensibilidad celular del eje embrionario-radícula, lo cual deriva al rompimiento de la testa y posteriormente la emergencia de las semillas.

Diferentes estudios corroboran los efectos positivos de las rizobacterias en la estimulación del proceso germinativo. León et al. (2015) obtuvieron incrementos cercanos al 30% en la germinación de semillas de maíz inoculadas con cepas bacterianas pertenecientes al género *Azotobacter* spp. Marquina et al. (2018) en su investigación determinaron que el porcentaje de germinación de las semillas de pimentón inoculadas con diferentes cepas de la familia *Rhizobiaceae* resultaron significativamente diferentes en un 13 y 23% en comparación al testigo. De igual manera Carriel (2021) encontró que los resultados obtenidos en el porcentaje de germinación de las semillas de *O. pyramidale* inoculadas con diferentes géneros bacterianos, superaron estadísticamente hasta en un 20% el tratamiento químico y sin inoculante bacteriano.

3.1.2 Crecimiento *in vitro* (Longitud y diámetro de brote)

En la Tabla 5, se muestran las medias obtenidas de las variables de crecimiento *in vitro*: En la variable longitud de brote se observan tres grupos estadísticos donde los mayores valores se presentaron en los tratamientos T5 (KG/M 10^{-4}) 10,46 cm, T3 (T/C 10^{-2}) 10,40 cm, T8 (Agua destilada) 9,87 y T1 (T/C 10^{-4}) con 9,67 cm.

De la misma forma la variable diámetro de brote tuvo significancia estadística, con un mayor diámetro en el T3 (T/C 10^{-2}) 2,18 mm. Es importante mencionar que el T3 registra una misma tendencia con respecto al porcentaje de germinación y longitud de brote.

Tabla 5. Efectos de la inoculación de rizobacterias en la longitud y diámetro de brote

Tratamientos	Medias- DB (mm)	Medias- LB (cm)
T1 (T/C 10^{-4})	2,04 ab	9,67 a
T2 (T/C 10^{-3})	1,54 d	6,15 bc
T3 (T/C 10^{-2})	2,18 a	10,40 a
T4 (T/C 10^{-5})	1,93 b	8,61ab
T5 (KG/M 10^{-4})	2,11 ab	10,46 a
T6 (KG/M 10^{-3})	1,67 d	6,41bc
T7(KG/M 10^{-5})	1,71cd	3,97 c
T8 (Agua destilada)	2,03 ab	9,87 a
T9 (New Giberned)	1,90 bc	7,91 ab

DB: Diámetro de brote; LB: Longitud de brote
Medias con una letra común no son significativamente diferentes
($p > 0,05$)

Soto et al. (2016) en su evaluación con respecto a la inoculación de rizobacterias nativas en dos híbridos de maíz, evidenciaron una mayor longitud de plántula (13, 60cm) en las semillas tratadas con un consorcio de bacteria/fertilizante ($N_{150}+P_{40}+K_{100}+FPM\ G2+VAI$). Por otra parte, Marquina et al. (2018) reportan una mayor longitud aérea y radicular bajo tratamientos con *Azospirillum* y *Sinorhizobium* en semillas de pimentón, con presencia de L-triptófano, los cuales atribuyeron los resultados obtenidos a la producción de AIA por parte de las rizobacterias, acotando también que la presencia de L-triptófano puede ser muy beneficiosa en el desarrollo vegetal, logrando estimular aún más el efecto promotor de las rizobacterias.

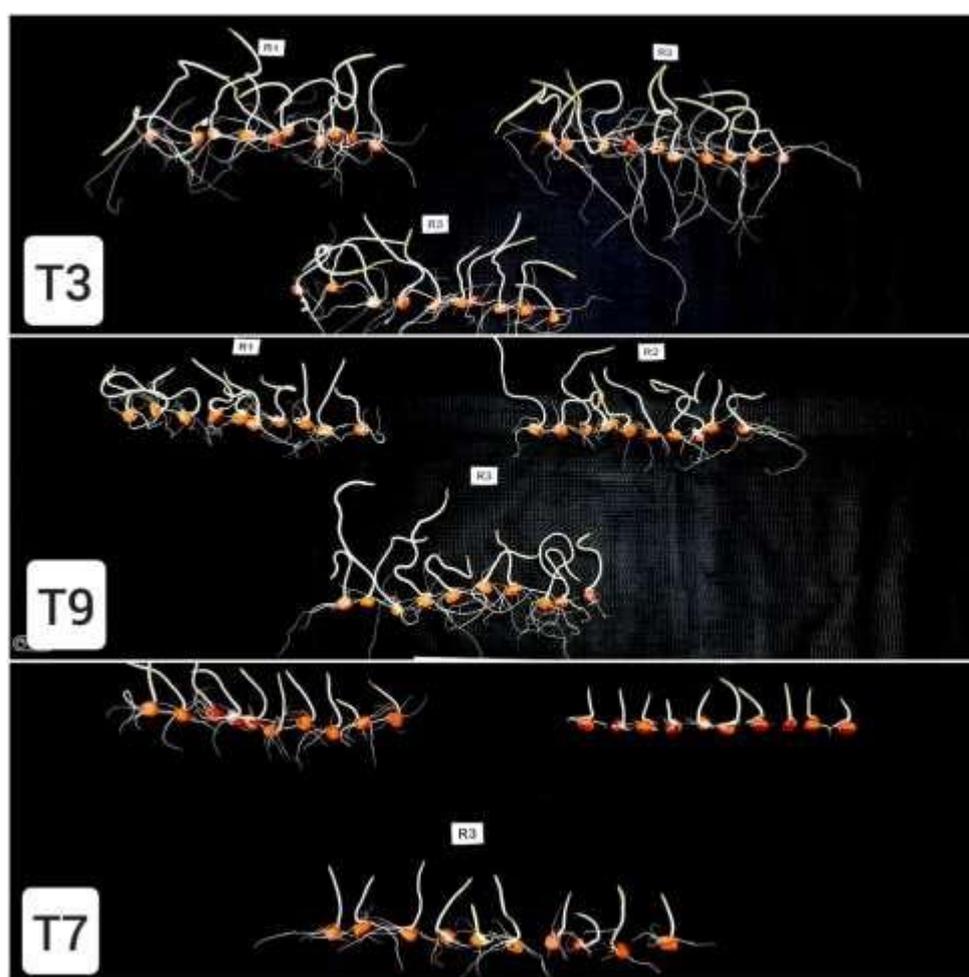


Figura 2. Comparación de variables de crecimiento *in vitro* en semillas de maíz

3.2 *Análisis de crecimiento y desarrollo (Vivero)*

3.2.1 *Frecuencia estomática*

Los datos obtenidos en el conteo estomático fueron sometidos a análisis de varianza; hallándose diferencias estadísticamente significativas entre el T5 (77

estomas/ mm^2 (AD) y 86 estomas/ mm^2 (AB)) el cual presentó una mayor cantidad de estomas, con respecto al T1 (53 estomas/ mm^2 (AD) y 68 estomas/ mm^2 (AB)) que tuvo menor frecuencia estomática. En la Figura 2 se muestran las medias en número de estomas del lado adaxial y abaxial

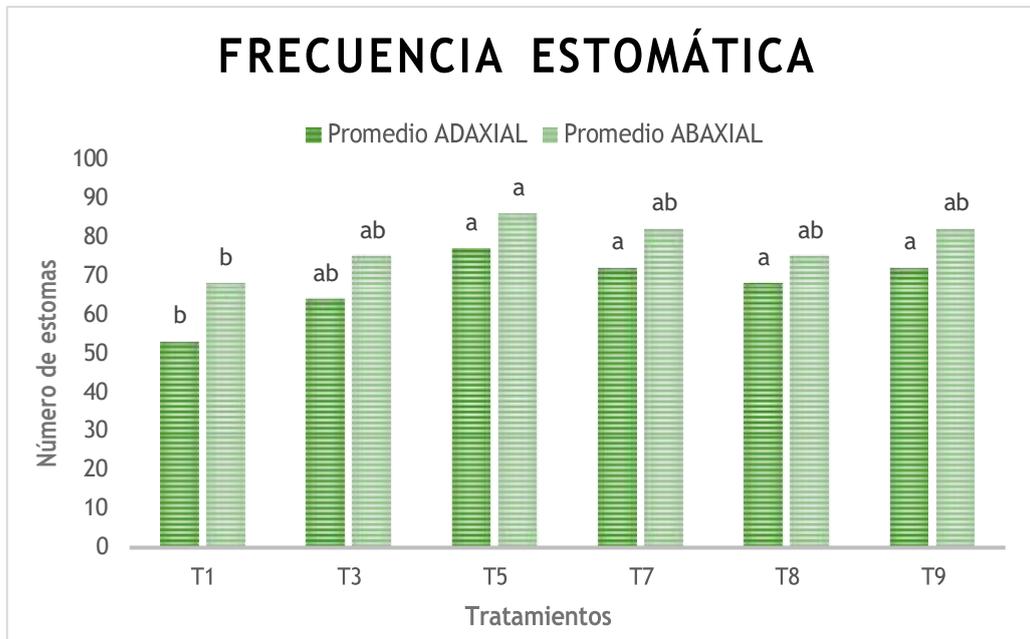


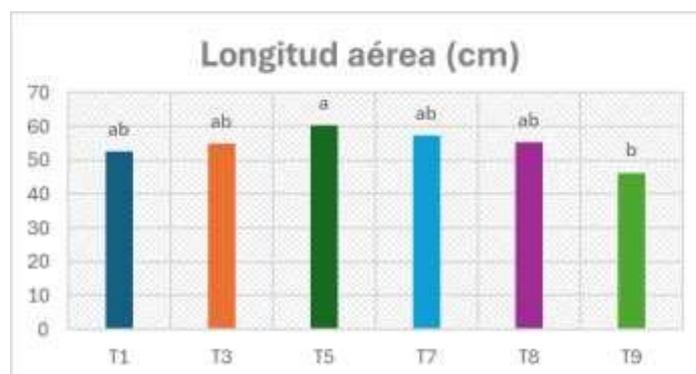
Figura 3. Número de estomas en hojas de maíz (*Zea mays*) bajo prueba de inoculantes rizosféricos (Posibles PGPR). Medias con una letra común no son significativamente diferentes

Casarrubias et al. (2019) realizaron un estudio evaluando el número y longitud estomática en hojas de maíz bajo diferentes dosificaciones de humus en donde no evidenciaron valores estadísticamente significativos entre tratamientos.

Esta investigación de acuerdo a los datos obtenidos y la literatura revisada donde se manifiesta que “*las PGPR son capaces de inducir a la resistencia sistémica de las plantas ante el estrés abiótico como la sequía*”, sugiere la posibilidad de que el uso de PGPR es capaz de influir sobre la frecuencia estomática en el cultivo de maíz.

3.2.2 Parámetros de crecimiento a los 30 DDT

A)



B)



C)



D)

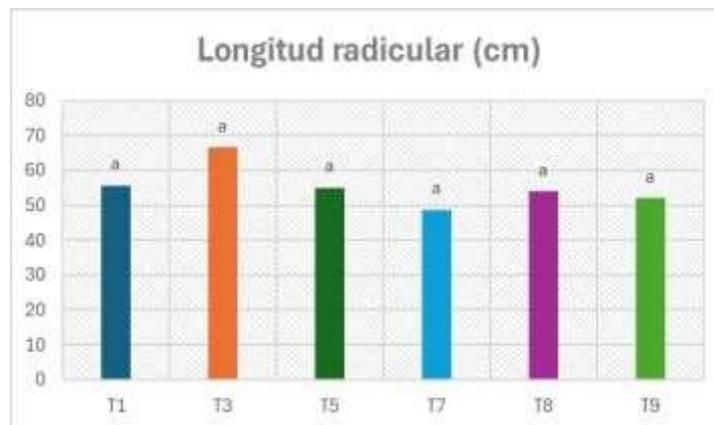


Figura 4. Longitud (A); Diámetro (B); Número de hojas(C); Longitud de raíz (D) de plantas de maíz (*Zea mays*), bajo prueba de inoculantes rizosféricos (Posibles PGPR) evaluados a los 30 DDT. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Los resultados mostrados en la Figura 3 demuestran que existen diferencias significativas entre los tratamientos T3 ($T/C 10^{-2}$) y T5 ($KG/M 10^{-4}$) con rangos superiores a los testigos.

La producción de reguladores de crecimiento intervino positivamente en la longitud del tallo, longitud radicular, diámetro de tallo y número de hojas, en donde a los 30 días después del trasplante (DDT) el T5 alcanzó una altura de 60,33 cm, superando a los tratamientos testigos en un 8 (T8) y 23% (T9) de su altura; de igual manera el T3 obtuvo

un mejor desarrollo respecto al diámetro del tallo (8 mm), resultando en un 4 (T8) y 25% (T9) superior a los testigos, además de registrar un aumento del 19 (T8) y 22% (T9) en la longitud radicular, a pesar de que esta variable no registró diferencias significativas entre tratamientos; también se evidenció que el T3 y T5 tuvieron significancia estadística en el número de hojas, frente a los tratamientos control.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo manifiesto por diferentes autores quienes corroboran que la inoculación de rizobacterias promueven un mejor crecimiento y desarrollo vegetal. Soto et al. (2016) reportaron un mayor desarrollo en longitud aérea (64,23 cm) a los 30 días del cultivo de maíz, inoculados con cepas del género *Rhizobium*. A su vez, Herrera et al. (2018) en su investigación manifiestan que, luego de cuatro semanas después de la siembra, las plantas de tomate inoculadas con *Azotobacter chroococcum* alcanzaron el doble del tamaño de las plantas en relación al control, además de evidenciar una diferencia significativa en el número de hojas de cada tratamiento. Bonilla (2018) en su estudio a los 39 DDT alcanza un diámetro de 7mm en maíz inoculados con *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*.

3.2.3 Porcentaje del peso fresco y seco de la parte aérea y radicular

En la Tabla 6, se detallan las medias obtenidas en el peso fresco y seco de la parte aérea y de la raíz, en donde de acuerdo al análisis de varianza no se presentaron diferencias significativas, sin embargo, cabe mencionar que existen diferencias numéricas entre el peso de los tratamientos, en donde el T3 presentó valores mayores en el peso húmedo (5,60 g) y seco (0,68 g) de la parte aérea, al igual que el T8 (testigo), obtuvo un mayor peso húmedo (2,66 g) y seco (0,32 g) radicular en comparación a los demás tratamientos. Por otra parte, los tratamientos que tuvieron mayor porcentaje de pérdida de agua en la parte aérea y radicular fueron los T5 (91,91%) Y T9 (89,02 %).

Tabla 6. Peso fresco y seco de la parte aérea y radicular del cultivo de maíz (*Zea mays*), evaluado a los 30 DDT

Tratamientos	PFA (g)	PSA (g)	% PA	PFR (g)	PSR (g)	% PR
T1 (T/C 10 ⁻⁴)	4,24 a	0,52 a	87,74 a	2,09 a	0,24 a	88,52 a
T3 (T/C 10 ⁻²)	5,60 a	0,68 a	87,86 a	2,42 a	0,32 a	86,78 a
T5 (KG/M 10 ⁻⁴)	5,07 a	0,41 a	91,91 a	2,21 a	0,26 a	88,24 a
T7 (KG/M 10 ⁻⁵)	5,06 a	0,57 a	88,74 a	1,76 a	0,20 a	88,64 a
T8 (Agua destilada)	5,11 a	0,57 a	88,85 a	2,66 a	0,32 a	87,97 a
T9 (New Giberned)	3,16 a	0,33 a	89,56 a	1,73 a	0,19 a	89,02 a

PFA: Peso fresco aéreo; PSA: Peso seco aéreo; PFR: Peso fresco radicular; PSR: Peso seco radicular; %PA: Porcentaje de peso aéreo; %PR: Porcentaje de peso radicular; g: Gramos. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Sharan et al. (2011) manifiestan que el incremento del peso foliar y radicular mediados por rizobacterias, es generalmente observado como una respuesta a la inoculación, puesto que estas tienen la capacidad de aumentar la absorción de las raíces mediante la conversión potencial de exudados radiculares, lo que a su vez estimula el desarrollo foliar.

Herrera et al. (2018) obtuvieron incrementos significativos en el peso húmedo y seco de la parte aérea y radicular de *Solanum lycopersicum* inoculado con cepas pertenecientes a *Azotobacter*, bajo invernadero. Huasasquiche et al. (2020) en su investigación observaron el efecto positivo de aislados posiblemente identificados como *Lysinibacillus macroides* en el desarrollo del cultivo de *Lupinus mutabilis* que, si bien no tuvieron diferencias significativas sobre sus medias estadísticas, logró incrementar en un 29% el peso seco del cultivo, respecto al control.

Tabla 7. Resumen de medias obtenidas en el crecimiento del cultivo de maíz (*Zea mays*) a los 30 DDT

Tratamientos	LA	DT	NH	PFA	PSA	LR	PFR	PSR
T1 (T/C 10 ⁻⁴)	52,67 ab	6,33 bc	4,33 ab	4,24 a	0,52 a	55,67 a	2,09 a	0,24 a
T3 (T/C 10 ⁻²)	55,00 ab	8,00 a	5,00 a	5,60 a	0,68 a	66,67 a	2,42 a	0,32 a
T5 (KG/M 10 ⁻⁴)	60,33 a	6,67 abc	5,00 a	5,07 a	0,41 a	55,00 a	2,21 a	0,26 a
T7 (KG/M 10 ⁻⁵)	57,33ab	6,67 abc	4,67 ab	5,06 a	0,57 a	48,67 a	1,76 a	0,20 a
T8 (Agua destilada)	55,33 ab	7,67 ab	4,67 ab	5,11 a	0,57 a	54,00 a	2,66 a	0,32 a
T9 (New Giberned)	46,33 b	6,00 c	4,00 b	3,16 a	0,33 a	52,00 a	1,73 a	0,19 a

LA: Longitud aérea; DT: Diámetro de tallo; NH: Número de hojas; LR: Longitud radicular; PSR: Peso seco radicular; PFA: Peso fresco aéreo; PSA: Peso seco aéreo; PFR: Peso fresco radicular. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Los tratamientos T3 (T/C 10⁻²) y T5 (KG/M 10⁻⁴) parecen ser los más efectivos en términos de promover el crecimiento aéreo y radicular del maíz, superando en varios parámetros al tratamiento comercial T9 (New Giberned). Esto sugiere que las cepas bacterianas utilizadas en T3 y T5 tienen un gran potencial como biofertilizantes, y podrían considerarse en estudios futuros para su aplicación en cultivos de interés agrícola.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- De acuerdo a los resultados obtenidos en las diferentes pruebas de germinación y desarrollo vegetativo del cultivo, se puede concluir que los inoculantes aislados nativos poseen una alta probabilidad de pertenecer al grupo de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR).
- Mediante el análisis de varianza, se evidenció que el T3 (T/C 10^{-2}), mantiene una tendencia de respuesta en el cultivo maíz, registrando diferencias significativas y valores superiores a los demás tratamientos en las variables porcentaje de germinación, diámetro de brote, longitud de brote, diámetro de tallo, número de hojas, peso fresco y seco aéreo, longitud radicular y peso seco radicular, seguidos por el T5 (KG/M 10^{-4}) y T1(T/C 10^{-4}), los cuales superaron los valores obtenidos con el tratamiento comercial (New Giberned), por lo cual se acepta la hipótesis planteada.
- Con respecto a la variable frecuencia estomática, no se realizaron pruebas fisiológicas que determinen el efecto de las mismas sobre el estrés hídrico, sin embargo, la literatura hace referencia a que las plantas con una menor frecuencia estomática pueden ser más resistentes a sufrir estrés por sequía.
- Los resultados obtenidos sugieren el potencial de estos microorganismos para ser utilizados como biofertilizantes en este cultivo, teniendo en cuenta que la selección de los aislados bacterianos, es muy importante, ya que los resultados pueden variar significativamente en respuestas, dependiendo del género de rizobacteria, genotipo de la planta y condiciones edafoclimáticas o de experimento en invernadero.

Recomendaciones

Se recomienda continuar con los estudios para la identificación de las rizobacterias, mediante caracterizaciones morfológicas, bioquímicas y moleculares.

Los resultados obtenidos en la variable de conteo de estomas en esta investigación, sugiere y da apertura a realizar pruebas fisiológicas y a analizar con más detalle si la aplicación de PGPR contribuye a cambiar la frecuencia de los estomas y consecuentemente a establecer plantas más resistentes a efectos abióticos.

Se sugiere realizar más estudios para comprender cuáles son los mecanismos de acción que poseen las cepas (T/C 10^{-2} ; T/C 10^{-4} ; KG/M 10^{-4}); en el desarrollo y producción del maíz y otros cultivos a nivel de campo.

Realizar otras investigaciones similares en diferentes regiones del país y en diversos cultivos, con el fin de ampliar la colección de cepas nativas, siendo estas una alternativa parcial al uso de fertilizantes y agroquímicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade F., Otegui E, Cirilo A, Uhart S (2023) Ecofisiología y manejo del cultivo de maíz 1a ed. - Balcarce: Libro digital, PDF
- Alfaro Maya C. (1974) Ontogenia y distribución de estomas en la primera hoja de plántulas de cuatro razas de maíz. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México
- Bewley J. D. (1997), Germinación y dormancia de semillas., The Plant Cell, volumen 9, número, páginas 1055–1066
- Benjumeda Daniel, M. (2017) Bacterias Promotoras Del Crecimiento Vegetal: Mecanismos y Aplicaciones. Tesis de grado. Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.
- Borbor Domínguez, V. (2014) Producción de maíz a partir de semillas inoculadas con *Rhizobium sp.* en Barcelona, Cantón Santa Elena. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Estatal Península de Santa Elena.
- Cool Zambrano C. (2010) Evaluación del biofertilizante a base de cepas de *Azospirillum spp.* en el cultivo de maíz (*Zea mays l.*) variedad Iniap-101, en complemento con tres tipos de fertilización, en el sector ainche, provincia de Chimborazo. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Universidad Estatal de Bolívar.
- Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC) (2023) Boletín técnico.
- Fiallos Núñez J. (2017) Determinación de la correlación entre Métodos Visuales, Ópticos y Difusión en placa en el Crecimiento de *Escherichia coli*. Tesis de grado. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato.
- Hernández, G. y Escalona, M. (2003) Microorganismos que benefician a las plantas: las bacterias PGPR. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Veracruz.
- Molina Herrera S. (2006) Desarrollo de un biofertilizante a partir de cepas de *Azospirillum spp.* para el cultivo de maíz (*Zea mays l.*), variedad Iniap 102 con dos fertilizaciones químicas y dos fertilizaciones orgánicas” Sibambe-Chimborazo. Tesis de grado. Ciencias Agrícolas, Ambientales y Veterinarias. Universidad Técnica de Cotopaxi.
- Marquina E., Ramírez Y., Castro Y (2018) ‘Efecto de bacterias rizosféricas en la germinación y crecimiento del pimentón *Capsicum annuum L.* var. Cacique Gigante’, Revista Scielo analytics. Bioagro, 30(1), 3-16.
- Montoro, A., Ruiz, M. (2017) Ecofisiología del cultivo de maíz dulce (*Zea mays L.* var. saccharata). Revista Horticultura Argentina 36 (91). ISSN de la edición on line 1851-9342
- León L.; Luis M. Rojas (2015) ‘Determinación del potencial promotor del crecimiento vegetal de *Azotobacter spp.* aislados de la rizósfera de malezas en cultivos de maíz (*Zea mays L.*)’. Scientia Agropecuaria, vol. 6, núm. 4, 2015, pp. 247-257
- Posada, A., Mejía, D., Polanco, D., Cardona, J. (2021) ‘Rizobacterias promotoras de

- crecimiento vegetal (PGPR): Una revisión sistemática 1990-2019', *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 12(2), 161 – 178.
- Ponce Quimís J (2021) Aplicación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en plantas de balsa *Ochroma pyramidale* (Cav. Ex Lam.) Urb. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Aniversidad Técnica Estatal de Quevedo.
- Ritchie, SW & JJ Hanway. (1982). How a corn plant develops. Iowa State University of Science and Technology. Cooperative Extension Service Ames, Iowa. Special Report N° 48.
- Reneé Pérez; Pérez Martínez; Iván Almeida (2021) Efecto de la inoculación de PGPR aisladas de maíz en el crecimiento de este cultivo bajo condiciones controladas. *Cultivos Tropicales*. Ediciones INCA, vol. 42, núm. 3, e12.
- Reyes Castillo, A. (2019) Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) y su aporte en la nutrición mineral de tomate (*Lycopersicon sculentum L.*). Doctorado. Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción.
- Romero Daniel R. (2017) Fuentes de fósforo y promotores de crecimiento (PGPR) en maíz chipá (*Zea mays L.* var. *Amilácea Sturtev.*) (AÑO II). Tesis de grado. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción
- Soto Valenzuela J., Alejandra Julio J., Lilibeth Crespo A. Gabriela Borbor T., Verónica Borbor D. (2016) 'Efecto de la inoculación de bacterias nativas en dos híbridos de maíz (*Zea mays l.*), Provincia de Santa Elena', *Revista Científica y Tecnológica UPSE*, Vol. III, N.2, Pág.50-60.
- Silvestre Perero, W. (2021) Respuesta del híbrido de maíz *Zea mays*, Pioneer 3041, a la aplicación de fertilizantes complejos en Rio Verde, Santa Elena., Tesis de grado. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Estatal Península de Santa Elena.
- Trewavas, A. (2003). Aspects of Plant Intelligence. *Annals of Botany* 92: 1-20

ANEXOS



Figura 1A. Desarrollo del ensayo

Nota: **A:** Reactivación de cepas bacterianas; **B:** Concentración celular (Mac Farland); **C:** Determinación del número exponencial bacteriano (Espectrofotometría); **D:** Inoculación de semillas (Etapa *in vitro*); **E:** Riego en bandejas germinativas **F:** Siembra; **G:** Reinoculación bacteriana (Etapa vivero); **H:** Conteo estomático.



Figura 1A. Prueba de germinación y emergencia de semillas de maíz (*Zea mays*), evaluadas a los 8 días, bajo inoculantes rizosféricos (posibles PGPR) comparados con agua destilada y producto comercial



Figura 2A. Toma de datos de la prueba de germinación y emergencia (Etapa *in vitro*)

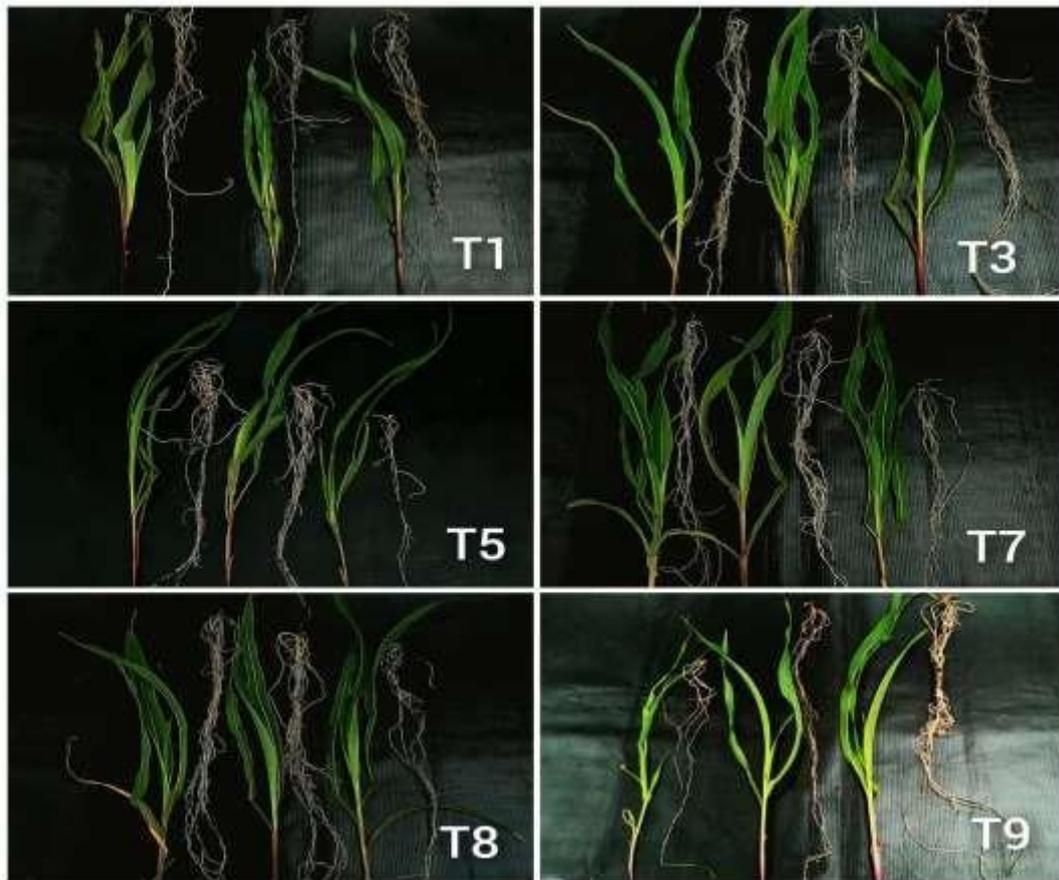


Figura 3A. Evaluación de crecimiento y desarrollo del cultivo de maíz bajo diferentes inoculantes bacterianos como posibles PGPR en comparación con agua destilada y producto comercial (Etapa vivero)

NOTA: T1: (T/C 10^{-4}); T3: (T/C 10^{-2}); T5: (KG/M 10^{-4}); T7: (KG/M 10^{-5}); T8: Agua destilada; T9: New Giberred.



Figura 4A. Toma de datos- Variables de desarrollo vegetativo

Tabla 1A. Análisis de varianza para las variables de germinación y emergencia en semillas de maíz evaluada a los 8 días luego de la primera inoculación bacteriana

Variable	N	R²	R² Aj	CV	
Porcentaje de germinación	27	0,80	0,67	28,86	
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	27548,15	10	2754,81	6,35	0,0006
Tratamientos	2666,07	8	333,26	0,77	0,6352
Repeticiones	24882,07	2	12441,04	28,69	<0,0001
Error	6939,26	16	433,70		
Total	34487,41	26			

Variable	N	R²	R² Aj	CV	
Longitud de brote	27	0,80	0,67	17,05	
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	12316,06	10	1231,61	6,36	0,0006
Tratamientos	12123,54	8	1515,44	7,83	0,0003
Repeticiones	192,52	2	96,26	0,50	0,6173
Error	3097,24	16	193,58		
Total	15413,31	26			

Variable	N	R²	R² Aj	CV	
Diámetro de brote	27	0,850	0,757	5,84	
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,123	10	0,112	9,101	0,0001
Tratamientos	1,121	8	0,140	11,358	<0,0001
Repeticiones	0,002	2	0,001	0,074	0,9289
Error	0,197	16	0,012		
Total	1,321	26			

Tabla 2A. Medias de las variables evaluadas en el proceso de germinación y emergencia de semillas de maíz

Tratamientos	%G	LB	DB
T1 (T/C 10 ⁻⁴)	80 a	96,74 a	2,04 ab
T2 (T/C 10 ⁻³)	75 a	61,55 bc	1,54 d
T3 (T/C 10 ⁻²)	86 a	103,96 a	2,18 a
T4 (T/C 10 ⁻⁵)	72 a	86,11 ab	1,93 b
T5 (KG/M 10 ⁻⁴)	81 a	104,56 a	2,11 ab
T6 ((KG/M 10 ⁻³))	64 a	64,10 bc	1,67 d
T7 (KG/M 10 ⁻⁵)	51 a	39,68c	1,71 cd
T8 (Agua destilada)	69 a	98,70 a	2,03 ab
T9 (New Giberned)	71 a	79,08 ab	1,9 bc

%G: Porcentaje de germinación; LB: Longitud de brote; DB: Diámetro de brote
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Tabla 3A. Análisis de varianza de las variables de desarrollo del cultivo de maíz a los 30 días posterior a la siembra.

Variable	N	R²	R² Aj	CV		
Longitud aérea	18	0,48	0,12	11,09		
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	343,17	7	49,02	1,34	0,3249	
Tratamientos	339,17	5	67,83	1,86	0,1894	
Repeticiones	4,00	2	2,000,05	0,9470		
Error	365,33	10	36,53			
Total	708,50	17				
Variable	N	R²	R² Aj	CV		
Diámetro aéreo	18	0,61	0,34	12,05		
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	10,89	7	1,56	2,26	0,1174	
Tratamientos	9,11	5	1,82	2,65	0,0894	
Repeticiones	1,78	2	0,89	1,29	0,3173	
Error	6,89	10	0,69			
Total	17,78	17				
Variable	N	R²	R² Aj	CV		
Número de raíces	18	0,56	0,25	9,43		
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	2,39	7	0,34	1,81	0,1911	
Tratamientos	2,28	5	0,46	2,41	0,1107	
Repeticiones	0,11	2	0,06	0,29	0,7514	
Error	1,89	10	0,19			
Total	4,28	17				
Variable	N	R²	R² Aj	CV		
Longitud radicular	18	0,41	0,00	20,89		
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	910,33	7	130,05	0,97	0,4982	
Tratamientos	558,00	5	111,60	0,84	0,5534	
Repeticiones	352,33	2	176,17	1,32	0,3102	
Error	1335,67	10	133,57			
Total	2246,00	17				

Tabla 4A. Análisis de varianza para la variable frecuencia estomática en hojas de maíz bajo inoculación bacteriana

Tratamientos	EAD	EAB
T1 (T/C 10 ⁻⁴)	53 b	68 b
T3 (T/C 10 ⁻²)	64 ab	75 ab
T5 (KG/M 10 ⁻⁴)	77 a	86 a
T7(KG/M 10 ⁻⁵)	72 a	82 ab
T8 (Agua destilada)	68 a	75 ab
T9 (New Giberned)	72 a	82 ab

EAD: Estomas adaxial; EAB: Estomas abaxial.
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)