

# *Pseudomonas putida* estimula el crecimiento de maíz en función de la temperatura

Dalia Molina-Romero<sup>1,2</sup>, Yolanda-Elizabeth Morales-García<sup>1,2</sup>, Ana-Laura Hernández-Tenorio<sup>1</sup>, Miguel Castañeda-Lucio<sup>3</sup>, Alma-Rosa Netzahuatl-Muñoz<sup>4</sup> y Jesús Muñoz-Rojas<sup>1</sup>  
Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias<sup>1</sup>, Escuela de Biología<sup>2</sup>, Laboratorio de Genética Molecular Microbiana<sup>3</sup>, Laboratorio de Biotecnología<sup>4</sup>  
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla<sup>1,2,3</sup>, Universidad Politécnica de Tlaxcala<sup>4</sup>  
Puebla, Pue.<sup>1,2</sup>; Tepetitla, Tlax.<sup>3</sup>; México  
molinardalia@gmail.com, ana4\_56@hotmail.com, almarosa.netzahuatl@uptlax.edu.mx,  
miguel.castaneda@correo.buap.mx, lissiamor, joymerre@yahoo.com.mx

**Abstract**— *Pseudomonas putida* KT2440 is a bacterium able to colonize plant roots and degrade toxic compounds from environment. The aim of present work was to evaluate the ability of this bacterium to promote the growth of autochthonous blue maize under two conditions of temperature: 30 and 40 °C. In this work we observed that the evaluated bacterium promoted the growth of maize in dependency of the temperature of plant development, with higher stimulation at 40 °C. We propose that this bacterium could protect the development of plants under stress conditions provoked by higher temperatures prevalent in agricultural fields of tropical or arid areas.

**Keywords**— *Pseudomonas putida*, Plant growth promoting rhizobacteria, temperature.

**Resumen**— *Pseudomonas putida* KT2440 es una bacteria con la capacidad de degradar compuestos tóxicos para el ambiente y coloniza eficientemente a las raíces de las plantas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la habilidad de esta bacteria para promover el crecimiento de maíz azul bajo dos condiciones de temperatura: 30 y 40 °C. En este trabajo se observó que esta bacteria es capaz de estimular el crecimiento del maíz en dependencia de la temperatura de desarrollo de las plantas, habiendo una mejor estimulación a 40 °C. Se propone que esta bacteria podría proteger a las plantas de las condiciones de estrés generados por elevadas temperaturas que ocurren en campos agrícolas de zonas tropicales o áridas.

**Palabras claves**— *Pseudomonas putida*, Rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas, temperatura.

## I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se han estudiado las capacidades de diversas bacterias para promover el crecimiento de plantas por ser una alternativa ecológica que podría disminuir el uso de agroquímicos en los campos de cultivo [1, 2]. Se han seleccionado bacterias benéficas que interaccionan bien con plantas para el desarrollo de inoculantes destinados para la agricultura [3, 4] y muchos de esos inoculantes han incrementado el rendimiento de los cultivos de forma exitosa. Por ejemplo, las formulaciones con *Azospirillum brasilense* han sido exitosos en casi un 70% con referencia a los sitios donde se han aplicado [5]. Sin embargo, otras bacterias como *Pseudomonas* spp. no han tenido resultados de éxito tan constantes en la promoción de crecimiento. En muchas ocasiones esta falta de éxito se ha atribuido a que las bacterias no son capaces de colonizar efectivamente a las plantas debido a que la población indígena es más competitiva que la inoculada [6]. No obstante, varios factores podrían estar involucrados y algunos de ellos han sido estudiados, por ejemplo, el acarreador del inoculante, aspectos de aplicación tecnológica, el tipo de suelo, la variedad de planta, el genotipo de bacteria usada, entre otros [7, 8, 9]. Otros factores como la temperatura, la humedad relativa y el fotoperiodo en el que se desarrollan las plantas son factores aun no estudiados en relación con la capacidad de bacterias para promover el crecimiento de plantas. Razón por la que se considera que aún se requieren estudios que indiquen cuales son las condiciones en las que una bacteria va a ser capaz o no de realizar la estimulación efectiva del crecimiento para plantas inoculadas.

*Pseudomonas putida* KT2440 es una bacteria muy estudiada por sus capacidades de llevar a cabo la degradación de compuestos tóxicos y su alta tolerancia a compuestos aromáticos [10, 11, 12]. Esta bacteria es una cepa derivada de *Pseudomonas putida* PWWO; la cual alberga al plásmido TOL (iniciales que refieren a la degradación de tolueno) implicado en el catabolismo de tolueno y xileno mediante las vías de toluato y xilato [13]. La cepa KT2440 se diferencia de la PWWO porque ya no contiene el plásmido TOL. A pesar de ello, aún es capaz de usar compuestos aromáticos como fuente de carbono y tolerar compuestos altamente recalcitrantes [11, 14], lo que muestra que también su genoma contiene información importante para la degradación de compuestos. El genoma de esta bacteria se conoce y ha mostrado varias potencialidades de la bacteria [15], muchas de ellas que aún no han sido estudiadas. Además esta bacteria no es patógena, razón por la que se ha certificado como biosegura [13, 16].

Por otro lado *P. putida* KT2440 es capaz de colonizar a la rizósfera de diversas plantas entre las que destaca el maíz [17, 18]. La alta capacidad para tolerar tóxicos orgánicos y su excelente colonización de plantas, hacen que la cepa KT2440 sea un excelente modelo para potenciar la rizorremediación de compuestos en suelos contaminados [19]. Además, se ha observado que esta bacteria desencadena una respuesta sistémica inducida (ISR; de sus siglas en inglés) en plantas de *Arabidopsis thaliana* [20] y maíz [21], que las protege contra patógenos y este mecanismo podría significar una manera para estimular su crecimiento [22]. Sin embargo, aún no se ha demostrado que *P. putida* KT2440 sea una bacteria que estimule el crecimiento de plantas. Por esta razón el objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de *P. putida* KT2440 para promover el crecimiento de maíz azul criollo bajo dos condiciones de temperatura máxima para el crecimiento de las plantas: 30 °C y 40 °C. En este trabajo se mostró que esta bacteria tiene la capacidad para estimular el crecimiento del maíz, pero este estímulo es dependiente de la temperatura en la que se desarrollan las plantas.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### A. Obtención de maíz axénico

Las semillas de maíz azul fueron esterilizadas superficialmente usando hipoclorito de sodio al 6.5% en acuerdo a trabajo previamente realizado [23]. El maíz fue enjuagado 10 veces con agua destilada estéril en una campana de flujo laminar para mantener condiciones de esterilidad. Los maíces axénicos fueron usados para los ensayos de inoculación con bacterias.

### B. Obtención de la suspensión bacteriana para inocular semillas de maíz

La bacteria usada en este trabajo fue donada por el grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos, Departamento de Protección Ambiental, Estación Experimental del Zaidín Granada, España. Esta cepa crece en medio LB adicionado con cloranfenicol a una concentración de 100 microgramos por mililitro (LB-Cm<sup>100</sup>) [24].

La bacteria fue crecida en 5 ml de medio LB-Cm<sup>100</sup> líquido a 30 °C durante 24 horas y a partir de este crecimiento se inoculó un matraz conteniendo 100 ml de medio LB-Cm<sup>100</sup>. Los cultivos fueron colocados en agitación a 200 rpm y 30 °C durante 24 horas para alcanzar una densidad máxima de crecimiento de 5 (fase estacionaria). El crecimiento bacteriano de los cultivos fue centrifugado a 4 °C durante 10 minutos a 5,000 rpm. El pellet obtenido fue resuspendido en el mismo volumen inicial con agua destilada estéril, la suspensión resultante se diluyó en proporción 1:100 y el número de bacterias fue determinado por quintuplicado mediante el método de conteo denominado “Goteo por Sellado en Placa Masivo” (GSPM) [25]. La suspensión bacteriana sirvió para inocular 55 semillas para cada tratamiento ensayado: dos a 30 °C (inoculado y no inoculado) y dos a 40 °C (inoculado y no inoculado). Para ello, las semillas fueron sumergidas durante una hora, tiempo suficiente para que esta

bacteria se adhiriera a las semillas de maíz [23]. Los controles consistieron en sumergir el mismo número de semillas axénicas en agua destilada estéril.

### C. *Sembrado de las semillas, adhesión y colonización bacteriana*

Tanto las semillas inoculadas como las no inoculadas, de cada tratamiento, fueron colocadas en macetas conteniendo 1L de vermiculita estéril; un soporte inerte ampliamente usado para evaluación de la colonización de bacterias en plantas [9, 26]. En cada maceta fue sembrada solo una semilla y posteriormente fueron regadas con 100 ml de solución MSJ [26] y agua destilada estéril. Las macetas fueron rotuladas para su identificación y se colocaron aleatoriamente bajo condiciones de invernadero, con fotoperiodo 16/8 luz/obscuridad, humedad relativa de 70 % y bajo dos condiciones diferentes de temperatura para el crecimiento de plantas: la primera fue a temperatura máxima de 30 °C durante el día y 20 °C en la noche. La segunda condición de crecimiento fue a una temperatura máxima de 40 °C durante el día y a 30 °C en la noche. Las plantas fueron regadas periódicamente a lo largo del experimento.

La adhesión de la bacteria fue evaluada 12 horas posteriores a la inoculación [23], para ello 5 semillas de cada tratamiento fueron extraídas de macetas independientes, cada una fue sumergida en 3 ml de agua destilada estéril y agitadas vigorosamente en vortex. La suspensión obtenida fue usada para cuantificar el número de bacterias que fueron capaces de adherirse a las semillas, para ello la suspensión fue diluida en factor 1:10 con agua destilada estéril y se usó el método de recuento GSPM mediante el sellado en placas de Petri con medio LB-Cm<sup>100</sup>. Semillas de tratamientos sin inocular se procesaron de la misma forma.

La colonización de bacterias fue evaluada a los 15, 30 y 45 días posteriores a la inoculación (dpi). Para ello, cinco plantas de cada tratamiento (inoculadas y controles) fueron extraídas de sus macetas, la vermiculita fue sacudida y las raíces con vermiculita más adherida fueron sumergidas en suficiente agua destilada estéril, se agitó vigorosamente y la suspensión obtenida fue diluida en factor 1:10 (peso/volumen) para realizar el recuento de bacterias mediante el método GSPM. En este trabajo la vermiculita más adherida a las raíces fue considerada como suelo rizosférico y se consideró que la suspensión resultante contiene bacterias de la rizósfera, como se ha sugerido en otros trabajos [9, 23, 26]. El peso de la vermiculita fue obtenido mediante el secado de las muestras sin las raíces a 70 °C durante 3 días y este valor fue considerado para ajustar el número de unidades formadoras de colonia por mililitro (No. UFC/ml) al número de unidades formadoras de colonia por gramo de vermiculita (No. UFC/g V) [26].

### D. *Evaluación de la estimulación de crecimiento*

La capacidad de *P. putida* KT2440 para promover el crecimiento de plantas de maíz fue evaluada a los 45 dpi en 30 plantas para cada tratamiento. En este trabajo se midió el peso seco de las plantas, para ello, éstas fueron extraídas de las macetas y las raíces fueron lavadas con cuidado para eliminar la vermiculita. Después, las raíces fueron separadas de la región aérea y se colocaron en bolsas de papel de forma independiente con etiquetas del tratamiento correspondiente. Las muestras fueron colocadas en una estufa para su secado a 70 °C durante 20 días. Después de este tiempo las muestras fueron sacadas de la estufa y colocadas a temperatura ambiente para pesarlas en una balanza analítica. Las mediciones fueron realizadas en 30 plantas para cada tratamiento. Los datos del peso seco fueron analizados de forma pareada usando la prueba *t*-student a una  $P \leq 0.05$  mediante el programa Sigma Plot de Handel scientific Software. Cuando hubo diferencias estadísticas los tratamientos fueron marcados con letras diferentes.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se usó maíz azul autóctono de Papalotla, Tlaxcala, México (Figura 1); debido a que no hay trabajos que reporten resultados de inoculación bacteriana en esta variedad, por su relevancia para la preparación de comida tradicional mexicana [27] y también por su alto contenido de antocianinas que podría impactar en beneficios a la salud [28, 29].



**Figura 1.** Maíz azul autóctono originario de Papalotla, Tlaxcala, México

La adhesión y la colonización son primordiales para que una bacteria realice una correcta interacción con las plantas [18, 20, 21, 30] y en consecuencia esto es un factor decisivo para permitir que una bacteria otorgue efectos positivos para la estimulación del crecimiento de plantas [9].

La suspensión bacteriana con la que se inocularon las semillas de este trabajo estuvo en el rango de  $10^6$  UFC/ml (Tabla 1) y cuya densidad celular fue suficiente para obtener una efectiva adhesión. Se observó que *P. putida* KT2440 se adhirió en números altos a las semillas de maíz azul, alrededor de  $10^7$  UFC/semilla (Tabla 1). Esos números son similares a los previamente reportados para maíz híbrido (var. Golden Jubilee) [21].

Tabla 1. Promedio del número de bacterias presentes en distintas etapas de la investigación y desviación estándar.

Temperatura máxima de desarrollo de plantas	Tratamiento de inoculación de plantas	Número de células de <i>P. putida</i> KT2440 en la suspensión para inocular. (Log No. UFC/ml)	Adherencia de <i>P. putida</i> KT2440 en semillas (Log No. UFC/semilla)	Colonización rizosférica de <i>P. putida</i> KT2440 (Log No. UFC/g V)		
				15 dpi	30 dpi	40 dpi
30 °C	Sin inocular	0 (agua)	0	0	0	0
	Inoculadas	6.10 ±0.38	7.40 ± 0.13	6.50 ±0.20	5.70 ±0.39	6.70 ±0.62
40 °C	Sin inocular	0 (agua)	0	0	0	0
	Inoculadas	6.82 ±0.29	7.75 ± 0.14	6.10 ±0.16	4.80 ±0.21	0

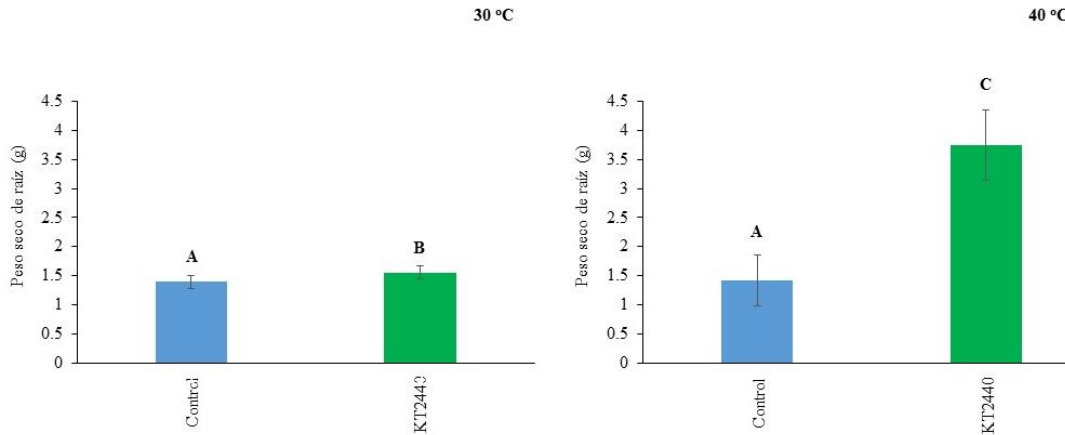
Se usó vermiculita estéril para realizar los experimentos de colonización y promoción de crecimiento de maíz, debido a que es un sustrato inerte con composición estándar sin fuentes de carbono o nitrógeno, ni minerales disponibles, razón por la que se pueden controlar los nutrientes que se adicionan para el crecimiento de las plantas y en este trabajo se adicionó MSJ [23, 26]. El uso de vermiculita estéril como sustrato también permite que las bacterias puedan colonizar a las plantas sin competencia de otra clase de microorganismos o efectos de la composición de un suelo no conocido.

La rizósfera se define como el suelo influenciado por los exudados de las raíces de las plantas [22] y en publicaciones previas se ha considerado que la vermiculita es un suelo controlado, razón por la que

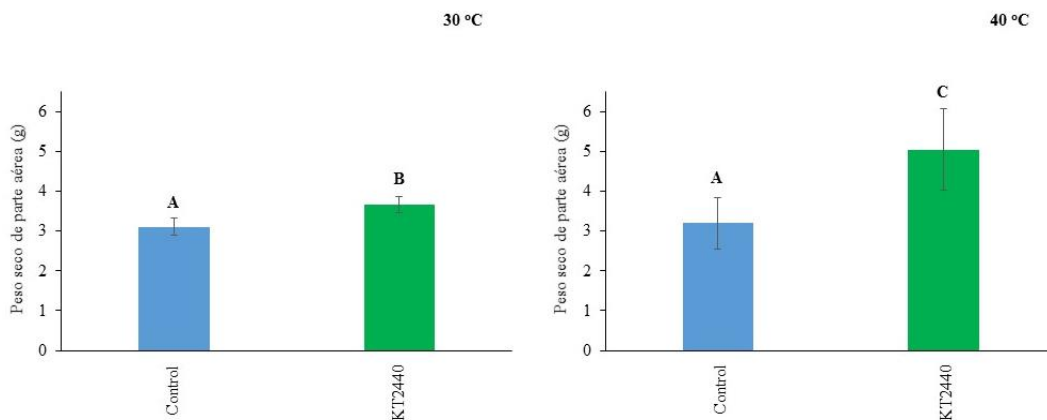
se valida que una suspensión bacteriana obtenida a partir de la vermiculita íntimamente asociada a las raíces de las plantas contiene bacterias rizosféricas [9, 23, 26] y en el trabajo presente también se hizo esa consideración. La colonización de *P. putida* KT2440 en la rizósfera fue muy similar en los dos experimentos explorados a los 15 dpi (Tabla 1), en valores alrededor a  $10^6$  UFC/g de V. A los 30 dpi, el número de bacterias que colonizaron la rizósfera de plantas que crecieron a temperatura máxima de 40 °C fue ligeramente menor que el número de bacterias observado a 30 °C. A 45 dpi, las bacterias solo se detectaron en el tratamiento a 30 °C y no a 45 °C. Desconocemos porqué disminuye la población de bacterias cuando las plantas crecen a 40 °C, no obstante otras bacterias también decrecen cuando interactúan con plantas a lo largo de su desarrollo, probablemente debido a los cambios fisiológicos que sufre la planta que impiden el establecimiento de las poblaciones bacterianas o bien porque se ha despertado una respuesta de defensa de las plantas que podría afectar a la misma población benéfica [9, 21, 26]. La colonización rizosférica de *P. putida* KT2440 en este trabajo fue similar a la observada en maíz de la variedad Golden Jubilee que fue reportada en valores de  $10^5$  UFC/g de peso fresco de raíz [21]. La colonización de rizósfera ha sido reportada para otras bacterias, por ejemplo, la colonización de *Burkholderia* sp., *B. megaterium* y *Sphingomonas* sp. ha sido observada en números alrededor de  $10^4$  UFC/g de peso fresco de raíz, después de cinco semanas de crecimiento de plantas de maíz [31, 32]. *P. fluorescens* fue capaz de colonizar las raíces de maíz en una población alrededor de  $10^5$  UFC/g de rizósfera a los 35 días de desarrollo [33]. A pesar de que la adhesión y la colonización de *P. putida* KT2440 a los 15 dpi fueron muy similares en los dos experimentos explorados (30 °C y 40 °C) los resultados de estimulación de crecimiento fueron diferentes. En el futuro será interesante conocer si la caída de población observada a los 45 dpi en plantas crecidas a temperatura máxima de 40 °C está relacionada con la mejor promoción de crecimiento de las plantas.

En acuerdo con publicaciones previas, los parámetros comúnmente usados para evaluar la promoción de crecimiento son la altura de las plantas, el diámetro de los tallos de las plantas, el peso fresco y seco de las plantas [9, 23, 26]. De estas mediciones, el incremento del peso seco de las plantas inoculadas con respecto a las no inoculadas es una de las más relevantes para demostrar que una bacteria promueve su crecimiento [32, 33]. En la presente investigación, se observó que las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 mostraron valores de peso seco incrementados con referencia a plantas no inoculadas, tanto de raíz como de región aérea (Figura 2 y 3). Bajo condiciones de temperatura máxima de desarrollo de las plantas (30 °C), se observó que las raíces de las plantas inoculadas con la bacteria fue ligeramente mayor (1.54 g) con referencia al de las plantas no inoculadas (1.39 g), pero estadísticamente diferentes (Figura 2). En estas condiciones los valores del peso seco de la región aérea de plantas inoculadas (3.66 g) fueron incrementados con referencia a las plantas no inoculadas (3.10 g) (Figura 3). Bajo la otra condición de temperatura máxima de desarrollo de las plantas (40 °C) se observó que las raíces de las plantas inoculadas con la bacteria fueron mucho mayores (3.75 g) con referencia al de las plantas no inoculadas (1.42 g) y son estadísticamente diferentes (Figura 2). Los valores del peso seco de la región aérea de plantas inoculadas (5.04 g) fueron altamente incrementados con referencia a las plantas no inoculadas (3.19 g) (Figura 3), bajo estas condiciones (40 °C).

El peso seco tanto de la región aérea como de las raíces de plantas no inoculadas fue estadísticamente igual para ambas condiciones experimentales (30 °C y 40 °C). Sin embargo, los resultados muestran que el peso seco de las plantas inoculadas fue mayor para la condición de crecimiento a temperatura máxima de 40 °C que los incrementos observados en temperatura máxima de 30 °C (Figura 2 y 3). Aunque los valores de promoción del crecimiento de plantas a 30 °C fueron menores a los observados a 40 °C, la apariencia de las plantas fue claramente mayor en plantas inoculadas en relación con no inoculadas (no mostrado).



**Figura 2.** Peso seco de las raíces de maíz azul tanto de plantas inoculadas como no inoculadas.



**Figura 3.** Peso seco de la parte aérea del maíz azul tanto de plantas inoculadas como no inoculadas

Existen varios mecanismos de promoción de crecimiento de plantas reportados para bacterias [3, 34]. Estos han sido clasificados en directos e indirectos [22]. En los mecanismos directos las bacterias benéficas proporcionan nutrientes esenciales para el desarrollo de las plantas entre los que destaca la fijación biológica de nitrógeno y la solubilización de fosfatos. En los mecanismos indirectos las bacterias benéficas afectan el crecimiento de fitopatógenos, ya sea por la producción de sustancias inhibitorias o bien por el desencadenamiento de una respuesta de defensa protectora en las plantas contra patógenos. Los mecanismos potenciales de *P. putida* KT2440 para estimular el crecimiento de plantas podrían ser la producción de sideróforos que está relacionada con su capacidad de adherencia a las semillas [35], la producción de sustancias inhibitorias que podría incrementar su competitividad [36, 37], el desencadenamiento de una respuesta de defensa efectiva contra patógenos de tipo ISR [20, 21]. En la cepa de *P. putida* BIRD-1 que está muy relacionada a *P. putida* KT2440 se ha demostrado la existencia de genes para la producción del ácido indol acético y solubilización de fosfatos [38] y la capacidad para solubilizar fosfatos también ha sido demostrada en la cepa *P. putida* Bo [39]; lo que podría sugerir que la cepa KT2440 también tiene esas capacidades. En el presente trabajo no sabemos cuál de estos mecanismos podría estar implicado en la promoción del crecimiento observada en las plantas de maíz azul. No obstante, es probable que la situación de estrés generado por el incremento de temperatura, permita una mejor expresión de los genes implicados en la estimulación de crecimiento. Se ha observado que dependiendo de la condición en la que se desarrolla *P. putida* KT2440 ocurre una expresión diferencial de sus genes [40] e incluso la expresión de genes varía en dependencia de la fase

de crecimiento de la bacteria [41]. Será importante en el futuro evaluar como ocurre la expresión de genes de interés, para potenciar la función benéfica de las bacterias que se asocian a plantas [1].

#### IV. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La promoción de crecimiento de *P. putida* KT2440 en maíz azul fue observada en las dos condiciones de temperatura máxima exploradas (30 y 40 °C). Sin embargo, la estimulación fue mayor a 40 °C con respecto a la condición de 30 °C. Es interesante notar que las bacterias de esta especie se adhirieron de forma adecuada al maíz azul y que colonizaron de forma similar en las dos condiciones de temperatura exploradas a los 15 dpi, pero el número de bacterias disminuyó en la condición de 40 °C, sugerimos que la respuesta de estimulación de crecimiento está relacionada con el estrés de la planta y que la bacteria contribuye a aliviarlo. Además, sugerimos que la bacteria expresa mejor sus genes de promoción de crecimiento en condiciones extremas de temperatura cuando interaccionan con las plantas. Trabajo futuro será necesario para averiguar cuáles son los mecanismos por los cuales *Pseudomonas putida* KT2440 es capaz de promover el crecimiento de maíz y porque esa capacidad se incrementa cuando la planta se crece a temperaturas elevadas.

#### RECONOCIMIENTOS

Agradecemos a Redes PRODEP 2015-2016 (CA-262), DITCo2016-3, VIEP-BUAP-2016 (00476 y 00513) por el apoyo para fines de investigación. D. Molina-Romero y A.-L. Hernández-Tenorio son becarias de CONACYT, por lo que agradecemos a esta institución. También agradecemos al Dr. Antonino Baez del CICM-ICUAP por sus valiosos comentarios sobre este trabajo.

#### REFERENCIAS

- [1] A. Baez-Rogelio, Y. E. Morales-García, V. Quintero-Hernández, and J. Muñoz-Rojas, “Next generation of microbial inoculants for agriculture and bioremediation”, *Microb. Biotechnol.*, Epub. Ahead of Print, doi: 10.1111/1751-7915.12448, October 2016.
- [2] L. A. Pazos-Rojas, V. Marín-Cevada, Y. E. Morales-García, Antonino Baez, M. A. Villalobos-López, M. Pérez-Santos, et al., “Uso de microorganismos benéficos para reducir los daños causados por la revolución verde”, *Rev. Iberoamer. Cienc.*, vol. XX, pp. xx–xx, December 2016. Aceptado para publicación.
- [3] B. Lugtemberg, and F. Kamilova, “Plant-Growth-promoting rhizobacteria”, *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 63, pp. 541–556, October 2009.
- [4] R. Vivanco-Calixto, D. Molina-Romero, Y. E. Morales-García, V. Quintero-Hernández, A. Munive-Hernández, A. Baez-Rogelio, et al., “Reto agrobiotecnológico: inoculantes de segunda generación” *Alianzas y Tendencias OCT-DITCo*, vol. 1(1), pp. 9–19, April 2016.
- [5] S. Dobbelaere, A. Croonenborghs, A. Thys, D. Ptacek, J. Vanderleyden, P. Dutto, et al., “Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*”, *Aust. J. Plant Physiol.*, vol. 28(9), pp. 871–879, September 2001.
- [6] J. E. Thies, P. W. Singlethon, and B. B. Bohlol, “Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol., 57(1), pp. 19–28, January 1991.
- [7] Y. Bashan, L. E. de-Bashan, S. R. Prabhu, and J. P. Hernandez, “Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013)”, *Plant Soil*, vol. 378(1-2), pp. 1–33, May 2014.
- [8] J. Caballero-Mellado, and L. E. Fuentes-Ramírez, “Bacterial biofertilizers”, in *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, vol. 1, Z.A. Siddiqui (ed.), Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2004, pp. 143–172.
- [9] J. Muñoz-Rojas, and J. Caballero-Mellado, “Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth”, *Microb. Ecol.*, vol. 46(4), pp. 454–464, December 2003.

- [10] P. Domínguez-Cuevas, J.-E. González-Pastor, S. Marquez, J.-L. Ramos, and V. de Lorenzo, “Transcriptional tradeoff between metabolic and stress-response programs in *Pseudomonas putida* KT2440 cells exposed to toluene”, *J. Biol. Chem.*, vol., 281(17), pp. 11981–11991, April 2006.
- [11] D. Benndorf, M. Thiersch, N. Loffhagen, C. Kunath, and H. Harms, “*Pseudomonas putida* KT2440 responds specifically to chlorophenoxy herbicides and their initial metabolites”, *Proteomics*, vol., 6(11), pp. 3319–3329, June 2006.
- [12] C. Roma-Rodríguez, P. M. Santos, D. Benndorf, E. Rapp, and I. Sá-Correia, “Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to phenol at the level of membrane proteome”, *J. Proteomics*, vol., 73(8), pp. 1461–1478, June 2010.
- [13] D. Regenhardt, H. Heuer, S. Heim, D. U. Fernández, C. Strömpl, E. R. B. Moore, *et al.*, “Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440”, *Env. Microbiol.*, vol., 4(12), pp. 912–915, December 2002.
- [14] J. I. Jiménez, B. Miñambres, J. L. García, and E. Díaz, “Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440”, *Env. Microbiol.*, vol., 4(12), pp. 824–841, December 2002.
- [15] K. E. Nelson, C. Weinel, I. T. Paulsen, R. J. Dodson, H. Hilbert, V. A. P. Martins dos Santos, *et al.*, “Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440”, *Environ. Microbiol.*, vol., 4(12), pp. 799–808, December 2002.
- [16] M. M. Bagdasarian, and K. N. Timmis, “Host vector systems for gene cloning in *Pseudomonas*”, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol., 43(4), pp. 287–293, June 1982.
- [17] J. M. Alatorre-Cruz, M. R. Bustillos-Cristales, H. Gutierrez-Sánchez, Y. E. Morales-García, D. Molina-Romero, A. R. Netzahuatl-Muñoz, y J. Muñoz-Rojas, “Estimulación del crecimiento de *Echinocactus platyacanthus* con bacterias PGPR”, *Saberes Compartidos, Rev. Invest. Cient. Tecnol. Hum.*, 11(7), pp. 33–40.
- [18] L. Molina, C. Ramos, E. Duque, M. C. Ronchel, J. M. García, L. Wyke, *et al.*, “Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions”, *Soil Biol. Biochem.*, vol., 32(3), pp. 315–321, March 2000.
- [19] M. Fernández, J. L. Niqui-Arroyo, S. Conde, J. L. Ramos, and E. Duque, “Enhanced tolerance of naphthalene and enhanced rhizoremediation performance for *Pseudomonas putida* KT2440 via the NAH7 catabolic plasmid”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol., 78(15), pp. 5104–5110, August 2012.
- [20] M. A. Matilla, J. L. Ramos, P. H. A. M. Baker, R. Doombos, D. V. Badri, J. M. Vivanco, *et al.*, “*Pseudomonas putida* KT2440 causes induced systemic resistance and changes in Arabidopsis root exudation”, *Environ. Microbiol. Reports*, vol., 2(3), pp. 381–388, June 2010.
- [21] C. Planchamp, G. Glauser, and B. Mauch-Mani, “Root inoculation with *Pseudomonas putida* KT2440 induces transcriptional and metabolic changes and systemic resistance in maize plants”, *Front. Plant Sci.*, vol., 5(179), pp. 1–10, January 2015.
- [22] D. Molina-Romero, M. R. Bustillos-Cristales, O. Rodríguez-Andrade, Y. E. Morales-García, Y. Santiago-Saenz, M. Castañeda-Lucio *et al.*, “Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico”, *Biológicas*, vol. 17(2), pp. 24–34, December 2015.
- [23] Y. E. Morales-García, D. Juárez-Hernández, C. Aragón-Hernández, M. A. Mascarúa-Esparza, M. R. Bustillos-Cristales, L. E. Fuentes-Ramírez, *et al.*, “Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter* sp. as a model for alternative agriculture”, *Rev. Argent. Microbiol.*, vol. 43(4), p.p. 287–293, December 2011.
- [24] J. Muñoz-Rojas, P. Bernal, E. Duque, P. Godoy, A. Segura, and J. L. Ramos, “Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol., 72(1), pp. 472–477, January 2006.
- [25] A. Corral-Lugo, Y. E. Morales-García, L. A. Pazos-Rojas, A. Ramírez-Valverde, R. D. Martínez-Contreras, and J. Muñoz-Rojas. Quantification of cultivable bacteria by the “Massive Stamping Drop Plate” method. *Rev. Colomb Biotecnol.*, vol., 14(2), pp. 173-182, December 2012.



- [26] O. Rodríguez-Andrade, L. E. Fuentes-Ramírez, Y. E. Morales-García, D. Molina-Romero, M. R. Bustillos-Cristales, R. D. Martínez-Contreras, *et al.*, “The decrease in the population of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane after nitrogen fertilization is related to plant physiology in split root experiments”, *Rev. Argent. Microbiol.*, vol. 47(4), pp. 335–343, December 2015.
- [27] R. Fernández-Suárez, L. A. Morales-Chávez, and A. Gálvez-Mariscal, “Importance of Mexican maize landraces in the national diet. An essential review”, *Rev. Fitotec. Mex.*, vol., 36(3), pp. 275–283, October 2013.
- [28] L. Lopez-Martínez, R. M. Oliart-Ros, G. Valerio-Alfaro, C.-H. Lee, K. L. Parkin, and H. S. García, “Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize”, *LWT Food Sci. Technol.*, vol., 42(6), pp. 1187–1192, July 2009.
- [29] Y. Salinas-Moreno, C. García-Salinas, B. Coutiño-Estrada, and V. A. Vidal-Martínez, “Variabilidad en contenido y tipo de antocianinas en granos de color azul/morado de poblaciones mexicanas de maíz”, *Rev. Fototec. Mex.*, 36(3-A), pp. 285–294, October 2013.
- [30] A. Von Felten, G. Défago, and M. Maurhofer, “Quantification of *Pseudomonas fluorescens* strains F113, CHA0 and Pf153 in the rhizosphere of maize by strain-specific real-time PCR unaffected by the variability of DNA extraction efficiency”, *J. Microbiol. Methods*, vol., 81(2), pp. 108–115, May 2010.
- [31] S. Saia, V. Rappa, P. Ruisi, M. Abenavoli, F. Sunseri, D. Giambalvo, *et al.*, “Soil inoculation with symbiotic microorganisms promotes plant growth and nutrient transporter genes expression in durum wheat”, *Front. Plant Sci.*, vol., 6, pp. 1–10, October 2015.
- [32] X. Sheng, L. Sun, Z. Huang, L. He, W. Zhang, and Z. Chen, “Promotion of growth and Cu accumulation of bio-energy crop (*Zea mays*) by bacteria: implications for energy plant biomass production and phytoremediation”, *J. Environ. Manage.*, vol., 103, pp. 58–64, July 2012.
- [33] I. Ahmad, M. J. Akhtar, H. N. Asghar, U. Ghafoor, and M. Shahid, “Differential effects of plant growth-promoting rhizobacteria on maize growth and cadmium uptake”, *J. Plant Growth Regul.*, vol., 35(2), pp. 303–315, June 2016.
- [34] B. R. Glick, “Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications”, *Scientifica*, vol., 2012(ID963401), pp. 1–15, September 2012.
- [35] M. A. Molina, J. L. Ramos, and M. Espinosa-Urgel, “A two-partner secretion system is involved in seed and root colonization and iron uptake by *Pseudomonas putida* KT2440”, *Environ. Microbiol.*, vol., 8(4), pp. 639–647, April 2006.
- [36] A. H. A. Parret, and R. De Mot, “Bacteria killing their own kind: novel bacteriocins of *Pseudomonas* and other  $\gamma$ -proteobacteria”, *Trends Microbiol.*, vol., 10(3), pp. 107–112, March 2002.
- [37] P. Bernal, L. P. Allsopp, A. Filloux, and M. A. Llamas, “The *Pseudomonas putida* T6SS is a plant warden against phytopatogens”, *ISME J.*, vol., 3, pp. 1–16, January 2017.
- [38] M. A. Matilla, P. Pizarro-Tobias, A. Roca, M. Fernández, E. Duque, L. Molina, *et al.*, “Complete genome of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* BIRD-1”, *J. Bacteriol.*, vol., 193(5), pp. 1290, March 2011.
- [39] A. Pandey, P. Trivedi, B. Kumar, and L. M. S. Palni, “Characterization of phosphate solubilizing and antagonistic strain of *Pseudomonas putida* (Bo) isolated from a sub-alpine location in the Indian Central Himalaya”, *Curr. Microbiol.*, vol., 53(2), pp. 102–107, August 2006.
- [40] M. I. Ramos-González, M. J. Campos, and J. L. Ramos, “Analysis of *Pseudomonas putida* KT2440 gene expression in the maize rhizosphere: in vitro expression technology capture and identification of root-activated promoters”, *J. Bacteriol.*, vol., 187(12), pp. 4033–4041, June 2005.
- [41] L. Yuste, A. B. Hervás, I. Canosa, R. Tobes, J. I. Jiménez, J. Nogales, *et al.*, “Growth phase-dependent expression of the *Pseudomonas putida* KT2440 transcriptional machinery analysed with a genome-wide DNA microarray”, *Env. Microbiol.*, vol., 8(1), pp. 165–177, January 2006.