

## Mejorando rasgos biométricos de plántulas de trigo con la inoculación de un consorcio nativo de *Bacillus*

Rosa Icela Robles Montoya<sup>1</sup>  
Luis Abraham Chaparro Encinas<sup>1</sup>  
Fannie Isela Parra Cota<sup>2</sup>  
Sergio de los Santos Villalobos<sup>1§</sup>

<sup>1</sup>Instituto Tecnológico de Sonora. 5 de febrero 818 Sur, Col. Centro, Ciudad Obregón, Sonora, México. CP. 85000. <sup>2</sup>Campo Experimental Norman E. Borlaug-INIFAP. Norman E. Borlaug km 12, Ciudad Obregón, Sonora, México. CP. 85000.

§Autor para correspondencia: sergio.delossantos@itson.edu.mx.

### Resumen

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) representan una alternativa para la disminución del uso de fertilizantes químicos y la mejora del aprovechamiento de estos por los cultivos agrícolas. En el estudio se determinó la capacidad de un consorcio bacteriano nativo del género *Bacillus* para promover el crecimiento de plántulas de trigo (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) bajo condiciones controladas, a los 30 días después de su inoculación. El consorcio se integró por las cepas TRQ8, TE3<sup>T</sup>, TRQ65 y TSO9. La identificación molecular (basada en el gen 16S RNAr) de dichas cepas reveló su afiliación taxonómica a *Bacillus megaterium* TRQ8, *B. cabrialesii* TE3<sup>T</sup>, *B. paralicheniformis* TRQ65 y *B. subtilis* TSO9. Dichas cepas mostraron la capacidad de sintetizar sideróforos, indoles, y solubilización de fosfatos, así como tolerancia a estrés térmico (43.5 °C), hídrico (PEG 10%) y salino (NaCl 5%). La inoculación ( $4 \times 10^7$  UFC) de dicho consorcio bacteriano a plántulas de trigo mostró un incremento significativo (comparado con las plántulas no inoculadas) en la longitud de la parte aérea (28%), longitud de raíz (25%), longitud total (28%), diámetro de tallo (46%), circunferencia (50%), peso seco de la parte aérea (72%) y el índice de biovolumen (57%). Lo anterior, evidencia la capacidad promotora del crecimiento vegetal de dicho consorcio bacteriano; por lo cual, el desarrollo de futuros ensayos bajo condiciones de campo es determinante para conocer la factibilidad del diseño de un biofertilizante que contenga las cepas estudio para su uso en la agricultura actual y futura.

**Palabras clave:** agricultura, bioinoculante, BPCV, seguridad alimentaria, Valle del Yaqui.

Recibido: enero de 2020  
Aceptado: febrero de 2020

El trigo (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial (Grijalva-Contreras *et al.*, 2016). En la actualidad, la producción de este cereal requiere el uso de grandes cantidades de fertilizantes químicos ( $\sim 300$  kg N ha<sup>-1</sup>), cuya tasa de aprovechamiento es del 20 al 35% (Grageda-Cabrera *et al.*, 2018). Lo cual conduce a problemas económicos y ambientales, tales como: la eutrofización, emisión de gases de efecto invernadero, y pérdida de la fertilidad del suelo (de los Santos-Villalobos *et al.* 2018; Liu y Xie, 2019). Por lo cual, es determinante la generación de alternativas agro-biotecnológicas sostenibles, que permitan mantener o incrementar los rendimientos agrícolas disminuyendo los efectos negativos al ambiente, salud humana, y economía del productor.

En los últimos años, ha surgido el interés por la generación de sistemas agrícolas integrales; a través, de la aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), las cuales son un grupo de bacterias que tienen la capacidad de mejorar la salud y calidad de las plantas, restaurando la fertilidad de los suelos (Rojas-Solís *et al.*, 2016; Valenzuela-Aragon *et al.*, 2019). Los efectos positivos mostrados por las BPCV han sido fuertemente asociados a diversos mecanismos de acción i) directos, asociados al crecimiento de las plantas, tales como: la producción de fitohormonas (auxinas, citocininas, y giberelinas), compuestos orgánicos volátiles (acetoína, y derivados del azufre), fijación biológica de nitrógeno, ciclaje y solubilización de nutrientes (Moreno-Reséndez *et al.*, 2018; Valenzuela-Ruiz *et al.*, 2018); e ii) indirectos, asociados a la resistencia de los cultivos a fitopatógenos, mediante la producción de lipopéptidos, antibióticos, o enzimas líticas (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018; Villa-Rodríguez *et al.*, 2019).

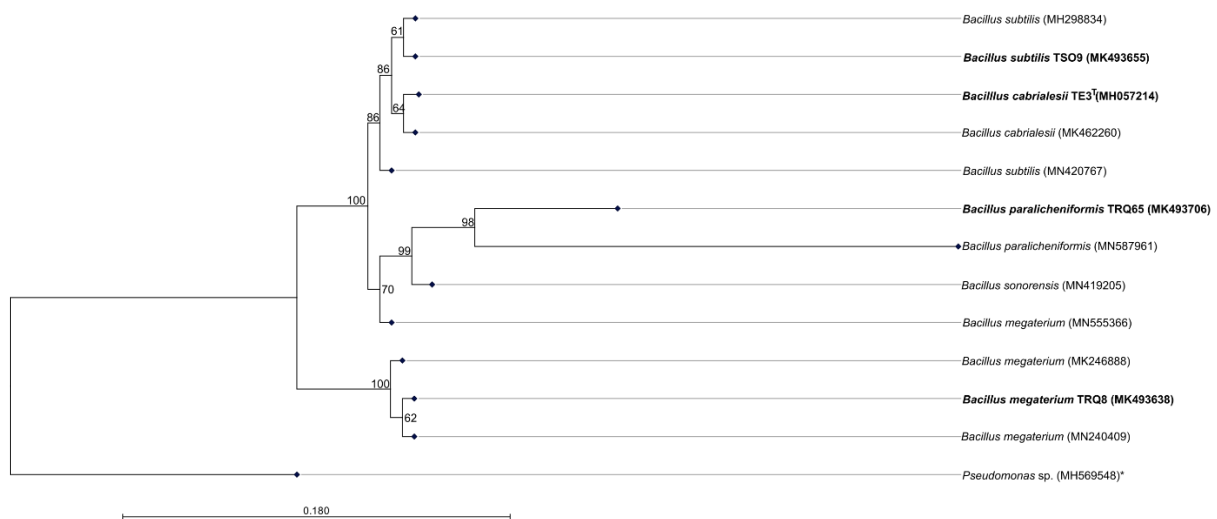
En la actualidad, existe un creciente interés por la formulación de estos productos biotecnológicos a partir de una o más especie o géneros bacterianos con capacidades fitoestimulantes, llamados consorcios bacterianos (Jha *et al.*, 2013). El objetivo del estudio fue evaluar la capacidad promotora del crecimiento del trigo, bajo condiciones controladas, de un consorcio bacteriano nativo integrado por cepas del género *Bacillus*, las cuales fueron aisladas del Valle del Yaqui, Sonora, México (región que contribuye con 50% a la producción de este cereal a nivel nacional).

Las cepas bacterianas en estudio (TE3<sup>T</sup>, TRQ8, TRQ65 y TSO9) fueron aisladas (por diluciones seriadas (1:10), utilizando agar nutritivo como medio de cultivo, a 28 °C) de la rizósfera del cultivo de trigo variedad CIRNO2008, cultivado en parcelas comerciales ubicadas en el Valle del Yaqui, Sonora, México (27°35'53.14" N y 110°2'53.26" W). Dichas cepas fueron preservadas en la Colección de Microorganismos Endófitos y Edáficos Nativos ([www.itson.edu.mx/COLMENA](http://www.itson.edu.mx/COLMENA)) (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018).

Las cepas TE3<sup>T</sup>, TRQ8, TRQ65 y TSO9 fueron caracterizadas metabólicamente para rasgos asociados a la promoción del crecimiento vegetal, tales como: solubilización de fosfatos, producción de índoles, tolerancia a estrés térmico, hídrico, y salino y clorotalonil (Valenzuela-Aragon *et al.*, 2019; Díaz-Rodríguez *et al.*, 2019). Así, TRQ8 fue la única cepa que mostró la capacidad de producir sideróforos (8.1  $\pm$  0.8%). Además, se observó que ciertas cepas en estudio mostraron la capacidad de solubilización de fosfatos (TE3<sup>T</sup>, 43.2  $\pm$  1.7%; TRQ8, 38  $\pm$  0.9%; TSO9, 54  $\pm$  1%), producción de índoles (TRQ8, 12  $\pm$  0.4; TRQ65, 28.8  $\pm$  0.9 ppm). Finalmente, todas las cepas mostraron la capacidad de tolerar el estrés térmico (43.5 °C), hídrico [Glicol polietileno (PEG), 10%, -0.84 mPa], salino (NaCl, 5%, 6.8 dS m<sup>-1</sup>) y químico (Clorotalonil).

La identificación molecular de las cepas en estudio se realizó mediante la secuenciación del gen 16S ARNr, con base en lo reportado por Valenzuela-Aragon *et al.* (2019). Las secuencias obtenidas se editaron con el software FINCH TV (Geospiza, Inc.; Seattle, WA, EE. UU; <http://www.geospiza.com>) y fueron comparadas con la base de datos de BLASTn de National Center for Biotechnology Information (NCBI) por sus siglas en inglés, considerando el porcentaje de máxima identidad. Las secuencias del gen 16S ARNr de las cepas estudiadas fueron depositadas en el NCBI Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y publicadas con el número de accesión: MH057214 (TE3<sup>T</sup>), MK493655 (TSO9), MK493638 (TRQ8) y MK493706 (TRQ65).

Las secuencias de DNA obtenidas fueron utilizadas para construir un árbol filogenético mediante el software CLC Sequence Viewer (CLC bio, Aarhus, Denmark), con el modelo de evolución Kimura80, y el modelo de construcción Neighbor-Joining. Dicha construcción se realizó con base en 1000 iteraciones para el cálculo del porcentaje de bootstrap. La secuencia del gen 16S ARNr de *Pseudomonas* sp. (MH569548) fue utilizada como 'outgroup'. Así, la cepa TRQ65 fue afiliada taxonómicamente a *Bacillus paralicheniformis* (cobertura 100% e identidad 100%) (Valenzuela-Ruiz *et al.*, 2019), TSO9 a *B. subtilis* (cobertura 100% e identidad 100%) (Villa-Rodriguez *et al.*, 2019), TE3<sup>T</sup> a *B. cabrialesii* (cobertura 100% e identidad 100%) (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2019) y TRQ8 a *Bacillus megaterium* (cobertura 100% e identidad 99.66%) (Robles-Montoya *et al.*, 2019). La afiliación taxonómica mencionada anteriormente fue soportada por el valor de bootstrap, indicando el porcentaje en el que la configuración de un clado se repite en 1000 simulaciones al azar o iteraciones (Figura 1).



**Figura 1.** Árbol filogenético construido con las secuencias del gen 16S ARNr de las cepas en estudio, con los modelos Kimura80 y Neighbor-Joining, los clados se determinaron con 1 000 iteraciones (bootstrap). \*= secuencia outgroup (*Pseudomonas* sp. MH569548).

El impacto de la inoculación del consorcio bacteriano integrado por *Bacillus megaterium* TRQ8, *B. paralicheniformis* TRQ65, *B. cabrialesii* TE3<sup>T</sup>, y *B. subtilis* TSO9 sobre rasgos biométricos de plántulas de trigo (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) variedad CIRNO C2008 fue estudiado. Para esto se realizaron pre-inóculos de cada cepa bacteriana, inoculando  $\sim 10^4$  unidades formadoras de colonia (UFC) mL<sup>-1</sup> en 10 mL de caldo nutritivo estéril (CN, DIBICO®) y se incubó a 28 °C con agitación continua (120 RPM) por 24 h. Posteriormente, los inóculos fueron generados inoculando

1 mL del pre-inóculo (densidad óptica a 600 nm: 0.5) en 500 mL de CN, e incubando bajo las condiciones descritas anteriormente. Finalmente, los cultivos bacterianos fueron centrifugados a 3 500 RCF, durante 15 minutos, realizando dos lavados con agua destilada estéril (15 lb, 121 °C, 15 min) y se ajustó la densidad celular de cada cepa en estudio a  $1 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>, con agua destilada estéril.

Las semillas de trigo fueron desinfectadas superficialmente, lavándolas con jabón comercial y embebiéndolas en agua destilada estéril (121 °C y 15 lb por 15min) durante 24 h, posteriormente las semillas fueron lavadas con NaCl al 2% durante 10 min, seguido de 3 lavados con agua destilada estéril. Las semillas desinfectadas fueron colocadas en 230 g de una mezcla de suelo estéril (121 °C y 15 lb por 5 días), en una proporción de 70:30 (perlita: suelo agrícola). El suelo agrícola utilizado fue colectado de parcelas comerciales destinadas a la producción de trigo en el Valle del Yaqui (vertisol hiposódico, pH 7.74  $\pm$  0.05, materia orgánica <1%, textura arcillosa 40-60%).

Un diseño unifactorial con dos tratamientos fue utilizado (dos repeticiones independientes, n= 15 por repetición): i) plántulas inoculadas ( $4 \times 10^7$  UFC, a los 0 y 15 días de siembra) por el consorcio en estudio vs; y ii) un control negativo (plántulas no inoculadas y asperjadas con agua destilada estéril). El experimento se realizó en una cámara de crecimiento (BJPX-A450, BIOBASE) bajo 70% de humedad relativa, temperatura de 25 °C (día) y 15 °C (noche), y un fotoperiodo de 14 h luz/12 h oscuridad, durante 30 días. Una vez concluido el experimento, las variables biométricas evaluadas en las plántulas fueron longitud total, altura, longitud de raíz, peso seco del brote y raíz, grosor del tallo, e índice de biovolumen (Thilagar *et al.*, 2016).

El consorcio bacteriano integrado por *Bacillus cabrialesii* TE3<sup>T</sup>, *B. paralicheniformis* TRQ65, *B. megaterium* TRQ8 y *B. subtilis* TSO9 mostró un incremento significativo respecto al tratamiento control [Fischer LSD ( $p \leq 0.05$ ), Statgraphics 5.0] sobre la longitud de la parte aérea (28%), longitud de raíz (25%), longitud total (28%), diámetro de tallo (46%), circunferencia (50%), peso seco de la parte aérea (72%) y el índice de biovolumen (57%) (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Efecto de la inoculación de un consorcio bacteriano del género *Bacillus* sobre plántulas de trigo, 30 días después de su inoculación, bajo condiciones controladas.** \*= diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) Fisher LSD.

Variable	Tratamiento	
	Control	Consortio bacteriano
Longitud de la parte aérea (cm)	18.59 $\pm$ 5.41	23.88 $\pm$ 3.75*
Longitud de la raíz (cm)	7.41 $\pm$ 2.24	9.33 $\pm$ 1.16*
Longitud total (cm)	26.01 $\pm$ 6.79	33.41 $\pm$ 5.55*
Diámetro del tallo (cm)	0.15 $\pm$ 0.04	0.22 $\pm$ 0.05*
Peso seco de la parte aérea (g)	0.05 $\pm$ 0.02	0.086 $\pm$ 0.03*
Peso seco de la raíz (g)	0.09 $\pm$ 0.02	0.1 $\pm$ 0.03
Índice de biovolumen	68.79 $\pm$ 29.96	177.21 $\pm$ 52.32*

El consorcio bacteriano estudiado incrementó la producción de biomasa y elongación celular en las plántulas de trigo inoculadas (Cuadro 1), lo cual puede estar asociado a la capacidad metabólicas de las cepas, ie. producción de indoles (12-28 ppm), sideróforos (8%), solubilización de fosfatos (38-54%), represión del crecimiento de microorganismos fitopatógenos, y resistencia a condiciones de estrés (Villarreal-Delgado *et al.* 2018; Valenzuela-Aragón *et al.*, 2019; Díaz-Rodríguez *et al.*, 2019; Villa-Rodríguez *et al.*, 2019). La inoculación de BPCV productoras de fitohormonas conduce a un incremento de la longitud y biomasa radicular de las plantas, potenciando la adquisición de nutrientes del suelo y promoviendo el crecimiento vegetal, incluso bajo condiciones de estrés (Valenzuela-Ruiz *et al.*, 2018); este efecto benéfico también está aunado a una mayor biodisponibilidad y movilización de nutrientes hacia la planta (Jacoby *et al.*, 2017). La capacidad de solubilizar fosfatos, así como la producción sideróforos, se ha asociado con el incremento en la tasa de crecimiento y rendimiento en trigo, manteniéndose dicho atributo bajo condiciones de estrés químico y dosis disminuida de fertilización inorgánica (Munir *et al.*, 2019).

Los resultados obtenidos en la presente investigación evidencian la compatibilidad y papel ecológico/funcional *in vivo* de las actividades metabólicas detectadas (y otras no descritas hasta el momento) en las cepas que integran el consorcio bacteriano en estudio (*Bacillus cabrialesii* TE3<sup>T</sup>, *B. paralicheniformis* TRQ65, *B. megaterium* TRQ8 y *B. subtilis* TSO9). Así, los efectos positivos observados en las plántulas de trigo inoculadas con el consorcio bacteriano desarrollado puede ser atribuido a la diversidad metabólica de las cepas del género *Bacillus* que lo integran, así como su capacidad para responder como un organismo a los diversos estresores ambientales, lo cual le otorga una capacidad incrementada de adaptación (interacciones sinérgicas para proveer nutrientes y estimular su crecimiento, degradación de compuestos inhibitorios, competición microbiana, entre otros), en comparación con cepas individuales.

## Conclusiones

La inoculación de un consorcio bacteriano conformado por las cepas *B. cabrialesii* TE3<sup>T</sup>, *B. paralicheniformis* TRQ65, *B. megaterium* TRQ8 y *B. subtilis* TSO9 incrementó significativamente rasgos biométricos en plántulas de trigo relacionados con la elongación celular, adquisición de biomasa y el uso eficiente del agua. Lo anterior sugiere que los atributos metabólicos mostrados por las cepas constituyentes del consorcio ejercen un efecto sinérgico sobre la adquisición de nutrientes, así como en la regulación de fitohormonas en la planta. Los resultados presentados sugieren evaluar dicho consorcio bacteriano bajo condiciones de campo, y desarrollar un biofertilizante para su uso en la agricultura actual y futura.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por el CONACYT al proyecto 257246, 'Interacción trigo\*microorganismos promotores del crecimiento vegetal: identificando genes con potencial agro-biotecnológico'. Además, la beca de maestría y doctorado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología (CONACYT) a Rosa Icela Robles Montoya y Luis Abraham Chaparro Encinas.

## Literatura citada

- de los Santos-Villalobos, S.; Parra-Cota, F. I.; Herrera-Sepúlveda, A.; Valenzuela-Aragon, B. and Estrada-Mora, J. C. (2018). Collection of edaphic microorganisms and native endophytes to contribute to national food security. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 9(1):191-202. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i1.858>.
- de los Santos-Villalobos, S.; Robles-Montoya, R. I.; Parra-Cota, F. I.; Larsen, J.; Lozano, P. & Tiedje, J. M. (2019). *Bacillus cabrialesii* sp. nov., an endophytic plant growth promoting bacterium isolated from wheat ( *Triticum turgidum* subsp. *durum* ) in the Yaqui Valley , Mexico. *Inter. J. System. Evol. Microbiol.* 69(12):3939-3945. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003711>.
- Díaz-Rodríguez, A. M.; Parra-Cota, F. I.; Santoyo, G. and de los Santos-Villalobos, S. 2019. Chlorothalonil tolerance of indole producing bacteria associated to wheat (*Triticum turgidum* L.) rhizosphere in the Yaqui Valley, Mexico. *Ecotoxicology.* 28(5):569-577. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02053-x>.
- Grageda-Cabrera, O. A.; Vera-Nuñez, J. A. and Peña-Cabriales, J. J. 2018. Efecto de los biofertilizantes sobre la asimilación de nitrógeno por el cultivo de trigo. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 9(2):281-289. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i2.1071>.
- Grijalva-Contreras, R. L.; Robles-Contreras, F. and Macías-Duarte, R. 2016. Nitrógeno en trigo y su efecto en el rendimiento y en la concentración de nitratos y potasio en el extracto celular de tallo ( ECT ). *Acta Universitaria.* 26(5):48-54. <https://doi.org/10.15174/au.2016.963>.
- Jacoby, R.; Peukert, M.; Succurro, A. and Koprivova, A. 2017. The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition-current knowledge and future directions. *Frontiers Plant Sci.* 8(1):1-19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01617>.
- Jha, M.; Chourasia, S. and Sinha, S. 2013. Microbial consortium for sustainable rice production. *Agroecol. Sustainable Food Systems.* 37(3):340-362. <https://doi.org/10.1080/10440046.2012.672376>.
- Liu, G. and Xie, H. 2019. Simulation of regulation policies for fertilizer and pesticide reduction in arable land based on farmers' behavior-using jiangxi province as an example. *Sustainability,* 11(136):1-22. <https://doi.org/10.3390/su11010136>.
- Moreno-Reséndez, A.; García-Mendoza, V.; Reyes-Carrillo, J. L.; Vasquez-Arroyo, J. and Cano-Ríos, P. 2018. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal : una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Plant growth promoting rhizobacteria: a biofertilization alternative for sustainable agriculture.* *Rev. Colomb. Biotecnol.* 20(1):68-83. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707>.
- Munir, I.; Bano, A. and Faisal, M. 2019. Impact of phosphate solubilizing bacteria on wheat (*Triticum aestivum*) in the presence of pesticides. *Brazilian J. Biol.* 79(1):29-37. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.172213>.
- Radhakrishnan, R.; Hashem, A. and Abd-Allah, E. F. 2017. *Bacillus*: a biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. *Frontiers in Physiol.* 8(1):1-14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00667>
- Robles-Montoya, R. I.; Parra Cota, F. I. and de los Santos Villalobos, S. 2019. Draft genome sequence of *Bacillus megaterium* TRQ8, a plant growth-promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) rhizosphere in the Yaqui Valley, Mexico. *3 Biotech.* 9(1):200-205. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1726-4>.

- Rojas-Solís, D.; Hernández-Pacheco, C. E. and Santoyo, G. 2016. Evaluation of *Bacillus* and *Pseudomonas* to colonize the rhizosphere and their effect on growth promotion in tomato (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.). *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 22(1):45-57. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2015.06.009>.
- Thilagar, G.; Appa, D. J. B.; Podile, R. and Rao, P. 2016. *Bacillus sonorensis*, a novel plant growth promoting Rhizobacterium in improving growth, nutrition and yield of chilly (*Capsicum annuum* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences.* <https://doi.org/10.1007/s40011-016-0822-z>.
- Valenzuela-Aragon, B.; Parra-Cota, F. I.; Santoyo, G.; Arellano-Wattenbarger, G. L. and de los Santos-Villalobos, S. 2019. Plant-assisted selection: a promising alternative for in vivo identification of wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *Durum*) growth promoting bacteria. *Plant and Soil.* 435(1-2):367-384. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-03901-1>.
- Valenzuela-Ruiz, Valeria; Ayala-Zepeda, M.; Arellano-Wattenbarger, G. L.; Parra-Cota, F. I.; García-Pereyra, G.; Aviña-Martínez, G. N. and de los Santos-Villalobos, S. 2018. Las colecciones microbianas y su potencial contribución a la seguridad alimentaria actual y futura. *Rev. Latinoam. Rec. Nat.* 14(1):18-25.
- Villa-Rodríguez, E.; Parra-Cota, F.; Castro-Longoria, E.; López-Cervantes, J. and de los Santos-Villalobos, S. 2019. *Bacillus subtilis* TE3: A promising biological control agent against *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of spot blotch in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*). *Biological Control.* 132(1):135-143. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.02.012>.
- Villarreal-Delgado, M. F.; Villa-Rodríguez, E. D.; Cira-Chavéz, L. A.; Estrada-Alvarado, M. I.; Parra-Cota, F. I.; de los Santos-Villalobos, S. 2018. The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Rev. Mex. Fitopatol.* 33(1):95-130. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>.