



Inoculación de *Burkholderia cepacia* y *Gluconacetobacter diazotrophicus* sobre la fenología y biomasa de *Triticum aestivum* var. Nana F2007 a 50% de fertilizante nitrogenado

Inoculation of *Burkholderia cepacia* and *Gluconacetobacter diazotrophicus* on phenotype and biomass of *Triticum aestivum* var. Nana-F2007 at 50% of nitrogen fertilizer

Jesús Jaime Hernández-Escareño¹; Pedro Gabriel Morales²; Rodolfo Farías Rodríguez²; Juan Manuel Sánchez-Yáñez^{2,*}

¹ Microbiología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nuevo León, Escobedo, N.L., México.

² Microbiología Ambiental, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich, México.

Recibido 24 octubre 2014. Aceptado 08 febrero 2015.

Resumen

El aumento en el consumo de *Triticum aestivum* (trigo) var Nana-F2007 requiere de la aplicación de fertilizante nitrogenado (FN), como NH_4NO_3 (nitrato de amonio), el que en exceso causa la pérdida de fertilidad del suelo. Una alternativa para reducir y optimizar la dosis de FN en *T. aestivum*, es inocular su semilla con géneros de bacterias promotoras del crecimiento vegetal endófitas (BPCVE). Se sugiere que cuando éstas invaden internamente su raíz inducen la síntesis de sustancias promotoras de crecimiento vegetal (SPCV), que mejoran la absorción radical del FN. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de inoculación de *Burkholderia cepacia* y *Gluconacetobacter diazotrophicus* en la fenología y biomasa de *T. aestivum* a dosis 50% del FN. En invernadero la semilla de trigo se trató con ambos géneros de BPCVE. Con las variables respuesta: fenología: altura de planta, longitud de raíz y biomasa peso fresco/seco total aéreo y radical a plántula y floración. Los resultados mostraron que *B. cepacia* en *T. aestivum* causó un incremento en su peso seco total (PST) con 0,61 g, valor estadísticamente significativo comparado con los 0,53 g del PST del trigo control relativo (CR) con el FN al 100%. La combinación *B. cepacia*-*G. diazotrophicus* en *T. aestivum* incrementó su PST con 4,23g, valor estadísticamente significativo comparado con los 1,13 g de PST del *T. aestivum* (CR). Lo anterior sugiere que *B. cepacia* y *G. diazotrophicus* mediante SPCV ejercieron un efecto positivo en la fenología y biomasa de *T. aestivum* a la dosis 50% del FN para esta variedad.

Palabras clave: xilema, colonización, rizósfera, sinergismo, absorción radical.

Abstract

Wheat (*Triticum aestivum* L) consuming requires of nitrogen fertilizer (NF), as ammonium nitrate (NH_4NO_3), which one in excess causes lost soil productivity. An alternative to reduce and optimize NF to wheat is to inoculate with endophytic promoting growth bacteria (EPGB), as genus *Burkholderia cepacia* and *Gluconacetobacter diazotrophicus* able to improve radical uptake of NF, its suggesting by inducing synthesis of growth promoting vegetal substances (GPVS). The aim of this research was to evaluate the inoculation of *Burkholderia cepacia* and *Gluconacetobacter diazotrophicus* on phenology and biomass of *T.aestivum* at 50% dose of NF. A trial in greenhouse condition was conducted inoculating seed *T.aestivum*'s with both EPGB by measuring its phenology: (PH) plant height, (RL) root length and biomass: total fresh weight (TFW) and dry (TDW) at seedling and flowering stages. Results showed a positive effect of *B. cepacia* in wheat on its TDW with 0.61g value statistically significant compared to 0.53g TDW of wheat used as relative control fed with NF 100% dose (RC). *B. cepacia* and *G. diazotrophicus* inoculated to wheat had a positive increased on its TDW with 4.23 g value statistically significant compared to 1.13 g TDW of wheat used as RC. Conclusion suggested that *B. cepacia* and *G. diazotrophicus* by synthesized GPVS had a positive effect on wheat growth at reduced dose of NF.

Keywords: xylem colonization, rhizosphere, synergism, radical uptake.

* Autor para correspondencia
E-mail: syanez@umich.mx (J.M. Sánchez-Yáñez).

1. Introducción

En México y en Latinoamérica el consumo de *Triticum aestivum* (trigo) es alto, sin embargo en los últimos años su producción ha disminuido por agotamiento de la productividad del suelo (Whitmore, 2000; Contreras-López *et al.*, 2008), en parte por el exceso de fertilizante nitrogenado (FN) aplicado comúnmente como NH_4NO_3 (nitrato de amonio) que en el suelo provoca la pérdida de su materia orgánica, en consecuencia lo empobrece (Cárdenas-Navarro *et al.*, 2004). Una opción para la reducir y optimizar el FN en *T. aestivum* var. Nana es la inoculación de sus semillas con géneros y especies de bacterias promotoras del crecimiento vegetal endófitas (BPCVE), las cuales tienen la capacidad de invadir el interior del sistema radical de gramíneas como *T. aestivum* para que ubicadas a nivel del xilema, transformen los azúcares de la fotosíntesis en sustancias promotoras del crecimiento vegetal (SPCV), que mejoran su capacidad absorción radical a pesar de reducir el FN hasta en un 50% (García-González *et al.*, 2005; Riggs *et al.*, 2001) y de esa manera contribuyen a su sano crecimiento (Sevilla *et al.*, 2001; Youssef *et al.*, 2004). Para los géneros y especies de las BPCVE es ventajosa evitar la competencia que sucede en el exterior de la rizosfera del *T. aestivum*, donde existe una amplia diversidad microbiana que también intenta colonizarla, cuando las BPCVE se establecen en el interior de las raíces de la planta, ejercen un efecto positivo en su crecimiento (Rosas *et al.*, 2009). Al respecto Bashan y Levanony 1990 describieron la importancia de que *Azospirillum* spp colonice el tejido interior radical de gramíneas para mejorar su respuesta a la aplicación de dosis del FN inferior a lo recomendado, sin riesgo de afectar negativamente su fenología y biomasa. Plana *et al.* (1999) reportaron una acción favorable de los géneros de *A. brasilense* y *B. cepacia* endófitas inoculadas en *T. aestivum* a la dosis 50% menor del FN de lo establecido. Mientras que

Chelius y Triplett *et al.* (2000) mostraron el efecto benéfico de la combinación de *A. brasilense* con *A. lipoferum* endófitas comparada con la forma individual con *Azotobacter beijerinckii* en el crecimiento de *T. aestivum* var. Pavon a la dosis 50% del FN. Al igual que Mora y Toro (2007), que demostraron el efecto positivo de *Burkholderia* sp endófitas en el funcionamiento del sistema radical de *Zea mays* a la dosis reducida en 50% del FN recomendado.

En la literatura es común y numerosa la información sobre la asociación y beneficio de géneros y especies de BPCVE en *Saccharum officinarum* (caña de azúcar) (Döbereiner *et al.*, 1993; Dibut *et al.*, 2005); pero mínima o inexistente relacionada con la inoculación de *Burkholderia cepacia* (Castellanos-Morales *et al.*, 2005) y/o *Gluconoacetobacter diazotrophicus* endófitas, como una opción adecuada de inoculación de su semilla para regular y optimizar la aplicación de la dosis reducida del FN, sin riesgo de afectar su sano crecimiento.

El objetivo de esta investigación fue evaluar la inoculación de *B. cepacia* y *G. diazotrophicus* sobre la fenología y biomasa de *T. aestivum* var. Nana-F2007 a la dosis del 50% del FN.

2. Materiales y métodos

Origen del suelo

Se utilizó un suelo laterítico sódico de textura arcilloso pobre en la concentración de la materia orgánica de 1,5% y N (nitrógeno) orgánico de 39 kg/ha, por explotación continua un suelo degradado y compacto, lo que de acuerdo a parámetro edafológicos se considera pobre para el nivel de materia orgánica y N orgánico; con un pH 6,7 ligeramente ácido derivado de un historial agrícola de 20 años por un sistema de cultivo intensivo cereal-cereal: maíz-trigo y maíz-cebada (Whitmore, 2000; Cárdenas-Navarro *et al.*, 2004). Este suelo se colectó de un sitio ubicado a los 19° 39' 27" de latitud norte 100° 19' 59" de

longitud oeste, con una altitud de 1820 msnm clima templado, temperatura media anual de 17,3 °C, precipitación anual de 796 mm, granizadas promedio 3-4/año, heladas 4-8/año e insolación 227:63 h:min; en un terreno agrícola denominado “La cajita” de la Tenencia Zapata del municipio de Morelia, Mich., sobre el km 5 de la carretera Morelia-Pátzcuaro, México, que se solarizó a 75°C/48 h para minimizar el problema de plagas y enfermedades (Sánchez-Yáñez, 2007).

Semilla de *T. aestivum* variedad Nana F2007

La semilla de *T. aestivum* var Nana F2007 fue desarrollada en México por el Programa Nacional de Trigo de Temporal del Instituto de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP). Esta variedad es recomendado para su cultivo en primavera tiene un porte semi-erecto al amacollamiento, con tallos tolerantes al acame con una altura promedio de 84 cm en promedio. Clasificada como una variedad de ciclo precoz de 85 hasta 134 días a madurez en ambientes de secos a lluviosos (Villaseñor *et al.*, 2014).

Origen de *Burkholderia cepacia* endófito de *Zea mays* sp *mexicana* y *Gluconoacetobacter diazotrophicus* endófito de *Saccharum officinarum*

La cepa de *B. cepacia* endófito se aisló de las raíces de *Z. mays* sp *mexicana*; en agar *Pseudomonas cepacia* ácido ázelaico triptamina o PCAT (g/L): Mg SO₄, 0,1; ácido ázelaico 0,20; triptamina 0,2 g (que se disolvió en 2 ml de alcohol absoluto): K₂HPO₄ 4; KH₂PO₄ 4; extracto de levadura, 0,02; el pH se ajustó a 6,7; las cajas de PCAT se incubaron a 28-30 °C por 72 h. Este aislado de *B. cepacia* se identificó por su perfil bioquímico (Calderón-Becerra *et al.*, 2000) con el sistema API-50CH (BioMerieux, Francia). Esta cepa de *B. cepacia* se comparó con las de referencia: *B. cepacia* ATCC 2546 y *B.vietnamiensis* TVV75 (Tran Van *et al.*, 2000) donadas por el Dr. J. Balandreau y el Dr. Tran Van. El aislado de *G. diazotrophicus* se recuperó de *S.*

officinarum (Dibut *et al.*, 2005) de su xilema, ubicación natural de *G. diazotrophicus* en caldo y Agar Lisina Glucosa Indol (ALGI) incubado a 32 °C / 24 h (Youssef *et al.*, 2004), este aislamiento se identificó hasta nivel de especie mediante el sistema API20NE (Salazar *et al.*, 2008).

Prueba in vitro para detectar la síntesis de sustancias promotoras de crecimiento vegetal por *Burkholderia cepacia* y *Gluconoacetobacter diazotrophicus* en semillas de *Phaseolus vulgaris*, *Z. mays* y *T. aestivum* var. *Nana*

Para demostrar que *B. cepacia* y *G. diazotrophicus* tuvieron la capacidad de sintetizar sustancias promotoras de crecimiento vegetal (SPCV), en específico algún tipo giberelina cada uno se sembró en APCAT y AGLI. Para ello se suprimió el agar y en forma líquida cada género de BPCVE se creció en un matraz de 250 ml con 100 ml de su respectivo medio de cultivo, estos matraces se agitaron a 250 rpm / 24-48 h / 30 °C. Posteriormente cada matraz de los dos géneros de las BPCVE se centrifugó a 3000 rpm/15 min; se eliminó cada paquete celular y el sobrenadante se filtró con una membrana milipore 0,2 μ estéril (Gelman, Co); para obtener un filtrado estéril libre de células de *B. cepacia* y *G.diazotrophicus*. Este ensayo se realizó con un diseño experimental con los siguientes tratamientos: a) los filtrados estériles libres de células de *B. cepacia* y *G.diazotrophicus*; b) giberelina pura 25 ppm de giberelina (Sigma, Co) disuelta en agua estéril y c) agua estéril. Para cada tratamiento se usaron 100 semillas de: *P.vulgaris*, *Z. mays* y *T. aestivum* colocadas en algodón humedecido esterilizado en caja de Petri, a 25-30 °C / 9 días. Las variables respuesta empleadas para evaluar el efecto de la aplicación de los filtrados libres de células de ambas BPCVE en las diferentes semillas fueron: el por ciento de germinación (%) y el tiempo de emergencia de las semillas (García-

González *et al.*, 2005; Tsavkelova *et al.*, 2006).

Inoculación de semillas de *T. aestivum* var. Nana-F2007 con *B. cepacia* y *G. diazotrophicus*

Para ello por cada 200 semillas de *T. aestivum* se empleó 10 ml de *B. cepacia* o *G. diazotrophicus* a densidad de 600×10^6 UFC/ml calculado con base a una cuenta viable en placa en APCAT y ALGI respectivamente. Cuando las 200 semillas de *T. aestivum* se trataron con ambas BPCVE se empleó 1 ml (0,5 ml de cada una) en relación 1:1 de *B. cepacia* y *G. diazotrophicus* (Bashan y Levanony, 1990; García-Reyna *et al.*, 2001).

Marcaje de *B. cepacia* o *G. diazotrophicus* para su recuperación de las raíces de *T. aestivum* var. Nana F2007

Para registrar la colonización de *B. cepacia* en las raíces del *T. aestivum* se utilizó su resistencia a cloranfenicol (Parke-Davis) y eritromicina (Abbot, Lab), cada uno en concentración de 50 µg/ml esterilizada por filtración (Milipore, Gelman, Co), a ese medio de cultivo se le codificó como APCATCE. Mientras que para estimar la colonización de las raíces de *T. aestivum* por *G. diazotrophicus* se empleó el ALG1 con una mezcla de cefalosporina 50 µg/ml (Glaxo, Lab) y cloranfenicol (Lakside, Lab) 200 µg /ml y se nombró AGLICC. Para ambas BPCVE en sus respectivos medios de cultivo se evitó el crecimiento de hongos por adición de 0,1 g/L de cicloheximida (Glaxo, Lab) (García-González *et al.*, 2005).

Recuperación de *B. cepacia* y *G. diazotrophicus* de raíces de *T. aestivum* Nana F2007

Para probar que la respuesta positiva de *T. aestivum* var. Nana F2007 fue causado por la aplicación de *B. cepacia* y *G. diazotrophicus* individual y/o en combinación de ambas. De las raíces de *T. aestivum* los dos géneros de BPCVE se recuperaron en los medios selectivos diseñados para ese objetivo: APCATCE y

AGLICC. En este caso de las raíces de *T. aestivum* se enjuagaron con agua corriente y eliminó el suelo adherido, luego esas raíces se desinfectaron superficialmente con etanol a 96% / 15 min; después con hipoclorito de sodio al 10% / 5 min; posteriormente estas raíces se enjuagaron 7 veces con agua destilada esterilizada y trituraron en un mortero con 5 ml de solución salina estéril; del triturado se tomó 0,1 ml para sembrar en APCATCE y AGICC ambos se incubaron por 5 días / 30 °C. La detección de las colonias de *B. cepacia* y *G. diazotrophicus* se basó en la resistencia de *B.cepacia* a cloranfenicol y eritromicina, así como en la tolerancia de *G.diazotrophicus* a cefalosporina y cloranfenicol que cada una mostro en APCATCE y AGICC. Además se incluyeron pruebas bioquímicas para su identificación (Riggs *et al.*, 2001; Rosas *et al.*, 2009).

Diseño experimental

En la Tabla 1 se muestra el diseño experimental utilizado para evaluar el efecto de las BPCVE en la fenología y biomasa de *T. aestivum* var. Nana F2007 a la dosis 50% de NH_4NO_3 (5g/L) o del FN. El ensayo se realizó en un suelo colocado en el sistema de jarra de Leonard bajo un diseño experimental con 5 tratamientos y 6 repeticiones.

Tabla 1

Diseño experimental para evaluar el efecto de la inoculación de *Burkholderia cepacia* y *Gluconacetobacter diazotrophicus* en la fenología y biomasa *Triticum aestivum* a la dosis 50% del fertilizante nitrogenado

Tratamiento/Trigo	Fertilizante nitrogenado (FN) NH_4NO_3 (g/L)
Agua (control absoluto) (CA)	Agua
Fertilizante nitrogenado 100% (control relativo) (CR/100)	10
Fertilizante nitrogenado 50% (control relativo) (CR50)	5*
<i>Burkholderia cepacia</i>	5
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	5
<i>Burkholderia cepacia</i> + <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	5

*50%= NH_4NO_3 =5g/L

Las variables respuesta fenológicas de *T. aestivum* a nivel de plántula y floración fueron: altura de planta (AP), longitud de raíz (LR) y de su biomasa: peso fresco total (PFT) y peso seco total (PST). Los datos experimentales se analizaron por ANOVA y Tukey para establecer la diferencia mínima significativa (García *et al.*, 2001). La dosis del FN para *T. aestivum* se definió con base a la dosis máxima recomendada (10 g/L) para la variedad Nana F2007, en la zona agrícola productora de este cereal en Pátzcuaro, Mich, México (Cortés y Ortiz, 2008, Villaseñor *et al.*, 2014).

3. Resultados y discusión

Efecto de la inoculación de las BPCVE en la germinación y días a emergencia de *T. aestivum* var. Nana

El por ciento de la germinación y los días a emergencia de la semilla de *T. aestivum* fueron inducidas por aplicación de *B. cepacia* y *G. diazotrophicus* en cuyo caso no fue estadísticamente diferente a la observada, cuando el *T. aestivum* se alimentó únicamente con el FN al 100% (CR/100), con el FN al 50% (CR/50), o solo irrigado con agua (datos no mostrados). Lo anterior sugiere que las BPCVE normalmente ejercen su efecto positivo en el tejido de plantas, y no en la semilla donde como el embrión permanecen en latencia (García-Reyna *et al.*, 2000; García-Reyna *et al.*, 2001; Rosas *et al.*, 2009).

Efecto de inoculación de *Burkholderia cepacia* y *Gluconoacetobacter diazotrophicus* en la fenología de *Triticum aestivum* fertilizada con la dosis 50% de NO_3NH_4

En la Figura 1 se observa el efecto favorable de *B. cepacia* en el aumento de la AP en el *T. aestivum* a nivel plántula con 46 cm, valor igual al registrado en *T. aestivum* inoculado con las dos géneros de BPCVE, solo con *G. diazotrophicus* lo que sugiere que en las raíces de la planta, tanto *B. cepacia* como *G. diazotrophicus* generaron SPCV que mejoraron la

absorción radical de la planta para incrementar la absorción del FN a pesar de reducirlo al 50% (Tsavkelova *et al.*, 2006), en estos casos el valor de la AP de *T. aestivum* no fue estadísticamente significativa o mejor que el comparado con la AP de *T. aestivum* usado como CR/100 con la dosis del FN recomendada, estos valores numéricos fueron estadísticamente superiores a los comparados con los 20 cm de AP de *T. aestivum* var Nana usado como CA irrigado solo con agua señalado en esa primera columna. También se indica el efecto positivo de *G. diazotrophicus* en la LR con 23,42 cm de *T. aestivum* lo que sugiere que esta BPCVE a nivel de los pelos radicales sintetizo SPCV, para estimular la elongación de su raíz y con ello se optimizó la absorción del FN reducido al 50%, este valor de la LR fue estadísticamente significativo y superior comparado con los 19 cm de la LR de *T. aestivum* alimentado exclusivamente con el FN al 100%, y sin inocular con las BPCVE empleado como (CR/100). Así como con los 15,50 cm de LR de *T. aestivum* con el FN al 50%, sin inocular con las BPCVE (CR/50) o con los 13.83 cm de LR de *T. aestivum* (CA) irrigado únicamente con agua.

El efecto benéfico de la inoculación de *B. cepacia* en la fenología de *T. aestivum*, en principio en su AP con 75cm. Esto sugiere que esta BPCVE (Castellanos-Morales *et al.*, 2005) mediante SPCV indujo la elongación de su sistema radical con un incremento en la absorción radical del FN a pesar de reducirlo 50% (Mora y Toro, 2007; Camelo *et al.*, 2011). El valor de la AP de este *T. aestivum* inoculado fue estadísticamente significativo comparado con los 48,5 cm de la AP de *T. aestivum* alimentado con el FN al 100% (CR/100) sin inocular con las BPCVE; o de los 45,5 cm de la AP de *T. aestivum* alimentado con el FN al 50% (CR/50) si inocular, y de los 41,75 cm del trigo (CA) irrigado únicamente con agua si inocular con las BPCVE. Se muestra el efecto positivo de *G. diazotrophicus* en el aumento de la LR

con 40,75 cm de *T. aestivum*; lo que sugiere que este género y especie aislada de *S. officinarum* también tiene potencial para sintetizar SPCV en el interior del sistema radical, de esa forma se favoreció el incremento en la elongación de sus raíces y simultáneamente se optimizó la absorción radical del FN a pesar de reducirlo al 50% (Sevilla *et al.*, 2001; Khallid *et al.*, 2001). El valor de la LR de este *T. aestivum* fue estadísticamente significativa y mejor comparada con los 31 cm de LR de *T. aestivum* usado como CR con el FN al 100% (CR/100), no inoculado con las BPCVE; así como con los 29,6 cm de la LR de *T. aestivum* alimentado con el FN al 50% (CR/50) sin inocular con las BPCVE y con los 28 cm de LR de *T. aestivum* empleado como CA irrigado únicamente con agua.

Efecto de inoculación de *Burkholderia cepacia* y *Gluconoacetobacter diazotrophicus* en la biomasa de *Triticum aestivum* fertilizada con la dosis 50% de NO_3NH_4

En la Figura 2 se muestra el efecto positivo de *B. cepacia* en el PFT con 3,76 g y en el PST con 0,717 g de *T. aestivum*, ello sugiere que este género y especie de BPCVE sintetizó SPCV en la raíz, lo que indujo a una mayor proliferación de raíces secundarias que optimizaron la absorción del FN a la dosis 50%, en consecuencia hubo un incremento en su biomasa. Lo anterior se apoyó en el hecho de que *B. cepacia* se detectó en el interior de las raíces del *T. aestivum* inoculado, pero no en él alimentado con el 100% del FN (CR/100), si inocular con las BPCVE como tampoco en el *T. aestivum* tratado con el FN al 50% (CR50) no inoculado; o él irrigado sólo con agua o CA (García-González *et al.*, 2005; Rosas *et al.*, 2009). Respecto a la biomasa los valores del PFT y PST de *T. aestivum* inoculado con las BPCVE fueron estadísticamente significativos y superiores comparado con los 1,87 g de PFT de *T. aestivum* sin inocular alimentado con la dosis del FN al 100% (CR/100) y con los 1,4 g de PFT de *T.*

aestivum tratado con el FN al 50% (CR/50) no inoculado y obviamente superior con los valores análogos de *T. aestivum* irrigado solo con agua o CA.

Además se registró el efecto positivo de la inoculación mixta con *B. cepacia* y *G. diazotrophicus* en *T. aestivum*; con un incremento en su PFT de 8,63 g y de 4,47 g de PST, lo anterior sugiere que ambos géneros de BPCVE sintetizaron SPCV en el interior del sistema redical mediante una acción conjunta y estimularon una mayor proliferación de raíces (Döbereiner *et al.*, 1993; James, 2000; Tsavkelova *et al.*, 2006) y de esa manera se optimizó la absorción radical del FN reducido al 50%. En tanto que los valores del PFT y PST en el *T. aestivum* fue consecuencia de la doble inoculación con ambas BPCVE; estos valores fueron estadísticamente significativos y superiores; comparados con los 4,01 g de PFT y 1,07 g de PST de *T. aestivum* alimentado con la dosis 100% del FN (CR/100) y sin inocular con las BPCVE; así como con los 3,1 g de PFT y 1,0 g de PST de *T. aestivum* alimentado con la dosis 50% del FN (CR/50) no inoculado, e incluso mayor a los valores de 2,45 g de PFT y de 1,13 g de PST de *T. aestivum* irrigado solo con agua del CA no inoculado con las BPCVE.

En la Tabla 1 se muestra la evidencia de que tanto *B. cepacia* como *G. diazotrophicus* cultivados en PCAT y GLI (sin agar) sintetizaron SPCV, del tipo de las giberelinas equivalente a la dosis 25 ppm. Puesto que el efecto positivo de los filtrados estériles libres células de ambos géneros de BPCVE en el por ciento de germinación y en los días a emergencia de las semillas de *P. vulgaris*, *Z. mays* y *T. aestivum* que fueron similares al efecto positivo registrado con la aplicación de 25 ppm de la giberelina (Asghar *et al.*, 2002; Camelo *et al.*, 2011).

Lo anterior indica una evidente acción de una fitohormona comparada con tratar las mismas semillas solo con agua.

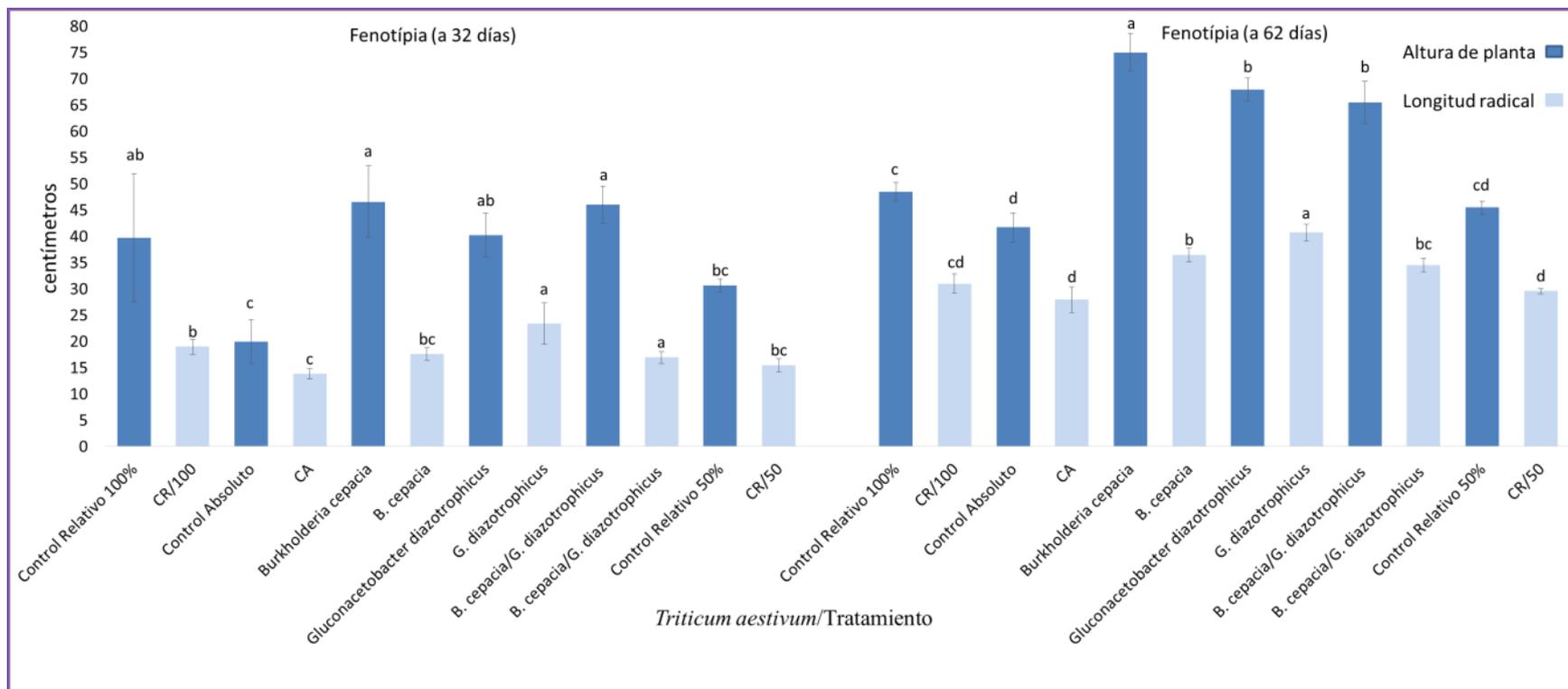


Figura 1. Inoculación de *Burkholderia cepacia* y *Gluconacetobacter diazotrophicus* en la fenología de *Triticum aestivum* var. Nana-F2007 a nivel de plántula 32 días y floración 62 días después de la siembra.

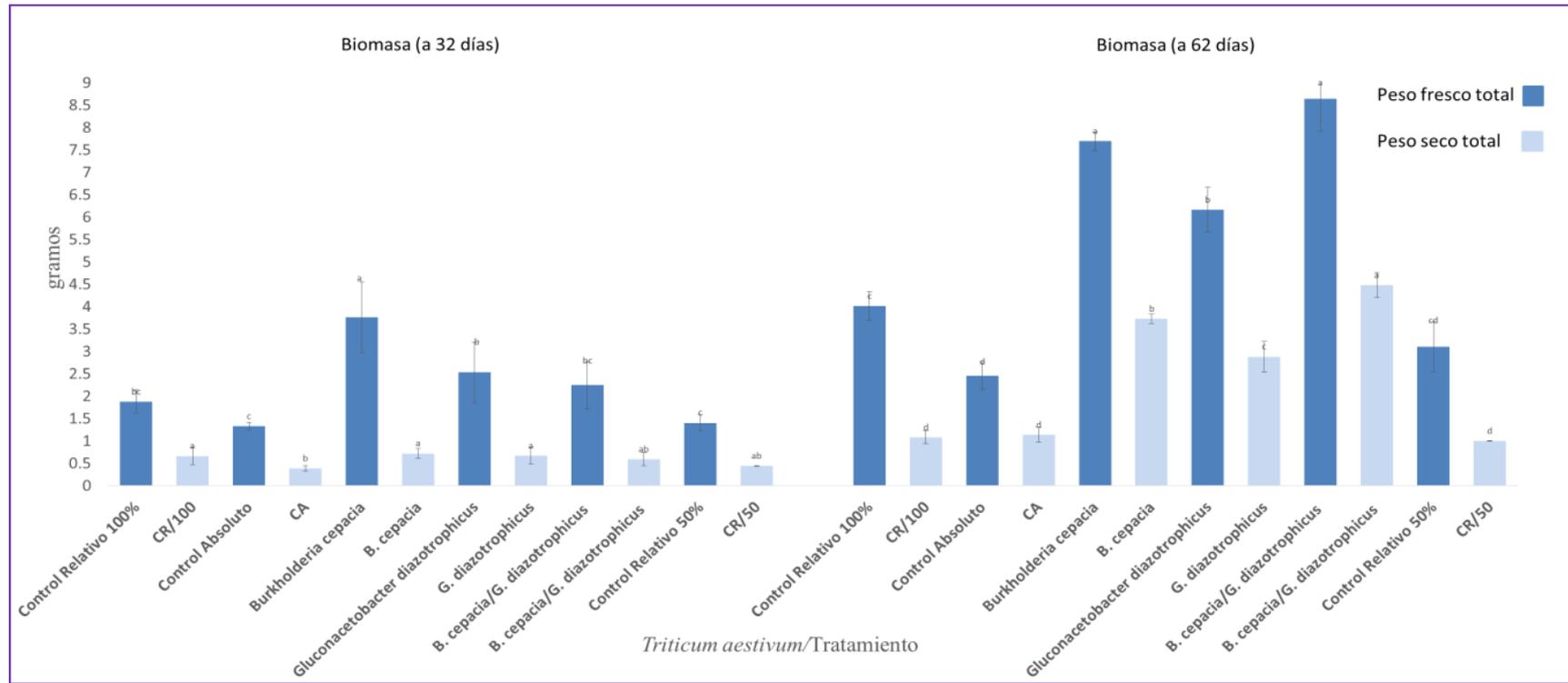


Figura 2. Inoculación de *Burkholderia cepacia* y *Gluconacetobacter diazotrophicus* en la biomasa de *Triticum aestivum* var. Nana-F2007 a nivel de plántula 32 días y floración 62 días después de la siembra.

Tabla 2

Efecto de sustancias promotoras de crecimiento vegetal (SPCV) en medio cultivo por *Burkholderia cepacia* y *Gluconoacetobacter diazotrophicus* en el porcentaje de germinación y días a emergencia de semillas de *Phaseolus vulgaris*, *Zea mays* y *Triticum aestivum*

Tratamientos	Porcentaje de germinación/días a emergencia		
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Zea mays</i>	<i>Triticum aestivum</i>
Agua estéril	80 ^{b*} ±0/7 ^{b*} ±0	60 ^{b*} ±0/8 ^{c*} ±0	60 ^{b*} ±0/7 ^{b*} ±0
Filtrado estéril libre de células de <i>Burkholderia cepacia</i>		100 ^a ±0/6 ^a ±0	100 ^a ±0/5 ^a ±0
Filtrado estéril libre de células de <i>Gluconoacetobacter diazotrophicus</i>		100 ^a ±0/6 ^a ±0	100 ^a ±0/6 ^b ±0
Giberelina (pura) 25 ppm		100 ^a ±0/6 ^a ±0	100 ^a ±0/5 ^a ±0

ANOVA, $p > 0,05$, Tukey HSD.

Los valores numéricos registrados en este ensayo no tuvieron diferencia estadísticamente significativa con los correspondientes cuando las semillas se trataron con los filtrados estériles libres de células de las BPCVE y la giberelina pura, pero si cuando estas semillas se les aplico solo con agua.

En la Tabla 1 se muestra la evidencia de que tanto *B. cepacia* como *G. diazotrophicus* cultivados en PCAT y GLI (sin agar) sintetizaron SPCV, del tipo de las giberelinas equivalente a la dosis 25 ppm. Puesto que el efecto positivo de los filtrados estériles libres células de ambos géneros de BPCVE en el por ciento de germinación y en los días a emergencia de las semillas de *P. vulgaris*, *Z. mays* y *T. aestivum* que fueron similares al efecto positivo registrado con la aplicación de 25 ppm de la giberelina (Asghar *et al.*, 2002; Camelo *et al.*, 2011). Lo anterior indica una evidente acción de una fitohormona comparada con tratar las mismas semillas solo con agua. Los valores numéricos registrados en este ensayo no tuvieron diferencia estadísticamente significativa con los correspondientes cuando las semillas se trataron con los filtrados estériles libres de células de las BPCVE y la giberelina pura, pero si cuando estas semillas se les aplico solo con agua.

4. Conclusiones

En este ensayo se demostró que *B. cepacia* y *G. diazotrophicus* ejercieron un efecto

benéfico en la fenología y biomasa, mediante la colonización del interior de su raíz que mejoró la absorción del FN reducido al 50%. El tipo de respuesta vegetal de *T. aestivum* sugiere una acción derivada de SPCV que aumentaron la densidad del sistema radical para contrarrestar la disminución de la dosis la FN, sin que ello tuviese un impacto negativo en su fenología y biomasa. Esta investigación probó que *G. diazotrophicus* no solo es útil para inocular *S. officinarum* sino que también es adecuado para la inoculación de *T. aestivum* a dosis reducidas de FN en combinación con *B. cepacia*.

Este tipo de trabajo amplía la información sobre las opciones que se tiene en agricultura sustentable para usar BPCVE en una mayor diversidad de cultivos agrícolas bajo esquemas de reducción y optimización de la FN, sin riesgo de causar un problema en su sano crecimiento, ni causar pérdida de la fertilidad del suelo o provocar la contaminación de agua superficial ni acuíferos, sin embargo es necesario demostrar que esto es válido con otras gramíneas de valor alimenticio.

Agradecimientos

Al proyecto 2.7 (2015) apoyado por la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH, Morelia, Mich, México y BIONUTRA, S. A. de CV, Maravatio, Mich, México.

5. Referencias bibliográficas

- Asghar, H.N.; Zahir, Z.A.; Arshad, M.; Khaliq, A. 2002. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biology Fertility Soils* 35: 231-237.
- Bashan, Y.; Levanony, H. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Canadian Journal Microbiology* 36: 591-608.
- Cárdenas-Navarro, R.; Sánchez-Yáñez, J.M.; Farías-Rodríguez F.; Peña-Cabriales J.J. 2004. Los aportes del nitrógeno en la agricultura. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 10: 173-178.
- Calderón-Becerra, M.A.; Balandreau, J.; Sánchez-Yáñez, J.M. 2000. Bacterias fijadoras de nitrógeno asociada a las raíces de teocinte (*Zea mays* sp mexicana L) y maíz (*Zea mays* L). *Cuatro Vientos* 16: 4-12.
- Castellanos-Morales, V.; Villegas J.; Cárdenas-Navarro, R.; Farías-Rodríguez, R.; Sánchez-Yáñez, J.M. 2005. Diversity of *Burkholderia cepacia* associated to teocinte. *Phyton* 54: 27-38.
- Camelo, M.; Vera, S.P.; Bonilla, R.R. 2011. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Corpoica* 12: 159-166.
- Contreras-López, E.; Jaimez-Ordaz, J.; Hernández-Madriral, T.; Añorve-Morga, J.; Beltrán-Hernández, R. 2008. Composición química de cebadas cultivadas bajo diferentes condiciones de labranza en tres localidades del estado de Hidalgo, México. *Bioagro* 20: 201-208.
- Cortés, J.M.; Ortiz, A. 2008. Recomendaciones de fertilización para el cultivo de trigo. V jornada de transferencia de tecnología del cultivo de trigo. Pp. 7-18. Disponible en: <http://www.fps.org.mx/divulgacion/attachments/article/1009/v-jornada-trigo.pdf>
- Chelius, M.K.; Triplett, E.W. 2000. Prokaryotic Nitrogen Fixation; Model system for the analysis of a biological process. Ed Horizont Scientific Press. Hwitts Lane Wymondahm NR18. England. pp: 1-20.
- Dibut, B.; Ortega, M.; Martínez, R.; Fey, L.; Ríos, Yoania. 2005. Nuevos aislados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en cultivos de importancia económica para Cuba. *Cultivos tropicales* 26: 5-10.
- Döbereiner, J.; Baldani V. L. D.; Olivares, F.; Reis V. M. 1993. Endophytic diazotrophs: the key to BNF in gramineous plants. Eds. NA Hegazi, M Fayez y Monib M. pp: 395-408. Soy. Univ. en El Cairo Press, El Cairo, Egipto.
- García, J.A.; Castillo, A.; Ramírez, M. E.; Rendón, G.; Larqué, M. U. 2001. Comparación de los procedimientos de Tukey, Duncan, Dunnett, HSU y Bechhofer para selección de medias. *Agrociencia* 35: 79-86.
- García-Reyna, M.J.; Plata, G.D.; Cárdenas, N.R.; Farías, R.R.; Sánchez-Yáñez, J.M. 2001. Isolation and effect of inoculation of maize with endophytic bacteria of teocinte. Meeting III on Rhizosphere, Dijon, France.
- García-Reyna, M.J.; Caballero, M.J.; Cárdenas, N.R.; Farías, R.R.; Sánchez-Yáñez, J.M. 2000. Aislamiento y densidad de bacterias endófitas de teocinte. XXV. Congreso Nacional de Microbiología, Mérida, Yucatán, México.
- García-González, M.M.; Farías-Rodríguez, R.; Peña-Cabriales, J.J.; Sánchez-Yáñez, J.M. 2005. Inoculación del trigo var. Pavón con *Azospirillum* spp y *Azotobacter beijerinckii*. *Terra Latinoamericana* 23: 65-72.
- James, E.K. 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research* 65: 197-209.
- Khalid, A.; Arshad, M.; Zahir, Z.A.; Khalid M. 2001. Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis. *Journal of Biological Sciences* 1: 750-754.
- Mora, E.; Toro, M. 2007. Estimulación del crecimiento vegetal por *Burkholderia cepacia*, una cepa nativa de suelos ácidos de sabanas venezolanas. *Agronomía Tropical* 57: 123-128.
- Plana, R.; Medina, N.; Moreno, I.; Ramírez, A. 1999. Efecto agronómico de la biofertilización con dos rizobacterias en la producción de trigo (*Triticum aestivum* L.) en Cuba. *Cultivos tropicales* 20: 5-8.
- Riggs, P.J.; Chelius, M.K.; Iniguez, A.L.; Kaeppler, S.M.; Triplett, E.W. 2001. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Australian Journal of Plant Physiology* 28: 829-836.
- Rosas, S.; Avanzini, G.; Carlier, E.; Pasluosta, C.; Pastor, N.; Rovera, M. 2009. Root colonization and growth promotion of wheat and maize by *Pseudomonas aurantiaca* SR1. *Soil Biology and Biochemistry* 41: 1802-1806.
- Salazar, E.Z.; Nieves, B.; Ruíz, J.; Vila, J. 2008. Utilidad del Sistema API 20NE para identificar especies del género *Acinetobacter* y otros bacilos Gram negativos no fermentadores. *Sociedad Venezolana de Microbiología* 28: 89-95.
- Sánchez-Yáñez J.M. 2007. Breve Tratado de Microbiología Agrícola, teoría y práctica, Ed. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. COSUSTENTA, SA de CV, CIDEM, SEDAGRO. Morelia, Michoacán, México.
- Sevilla, M.; Burris, R.H.; Nirmala-Gunalapa, G.L.; Kennedy, C.; Gunalapa, N. 2001. Comparison of benedit to sugarcane plant growth and N₁₅ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif-mutant strains. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 358-366.
- Tran Van, V.; Berge, O.; Ngo Ke, S.; Balandreau, J.; Heulin, T. 2000. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid of Vietnam. *Plant and Soil* 218: 273-284.
- Tsavkelova, E.; Klimova, S.; Cherdyntseva, T.; Netrusov, A. 2006. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Applied Biochemistry Microbiology* 42: 117-126.
- Villaseñor, M.H.; Espitia, R.E.; Huerta, E.J., Solas, M.E.; Ireta, M.J.; Osorio, A.L.; Perez, H.P. 2014. Nana F2007, cultivar de trigo para siembras de temporal en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7: 1363-1368.
- Whitmore, A.P. 2000. The biological management of soil fertility project. *Netherland Journal Agriculture Science* 48: 115-122.
- Youssef, H.; Fayez, M.; Monib, M.; Hegazi, N. 2004. *Gluconacetobacter diazotrophicus*: a natural endophytic diazotroph of Nile Delta sugarcane capable of establishing an endophytic association with wheat. *Biology and Fertility of Soils* 39: 391-397.