

Caracterización metabólica de cepas promotoras de crecimiento de plantas y pruebas de germinación con lenteja (*Lens culinaris*)

Metabolic characterization of plant growth promoter strains and germination tests with lentil (*Lens culinaris*)

GÓMEZ-LUNA, Blanca Estela*†, RAMÍREZ-GRANADOS, Juan Carlos, DÍAZ-PÉREZ, César y VELOZ-GARCÍA, Rafael Alejandro

Universidad de Guanajuato, Campus Celaya-Salvatierra, Departamento de Ingeniería Agroindustrial

ID 1^{er} Autor: Blanca Estela, Gómez-Luna / CVU CONACYT ID: 101592

ID 1^{er} Coautor: Juan Carlos, Ramírez-Granados

ID 2^o Coautor: César, Díaz-Pérez / CVU CONACYT ID: 101579

ID 3^{er} Coautor: Rafael Alejandro, Veloz-García / ORC ID: 0000-0002-6493-5708, Researcher ID Thomson: S-5809-2018, CVU CONACYT ID: 163099

Recibido Abril 15, 2018, Aceptado Junio 30, 2018

Resumen

Las bacterias promotoras de crecimiento en plantas, son un grupo de diferentes géneros de bacterias que pueden incrementar el crecimiento y la productividad vegetal, dichas bacterias podrían ser una herramienta biotecnológica sostenible como biofertilizante y biocontrolador. Se realizó el aislamiento de rizobacterias en suelo adherido a árboles, mezquite (*Prosopis laevigata*) y encino (*Quercus rugosa*) nativos de la región de Guanajuato, dentro de las Zonas Naturales Protegidas del estado. Se obtuvieron 100 cepas con actividad de ACC desaminasa, de las cuales para 50 aislados se realizaron pruebas de caracterización, confrontación de hongos fitopatógenos, germinación de semillas de lenteja (*Lens culinaris*). Las cepas 112, 255, 258 y 303 obtuvieron resultados favorables en todas las pruebas.

Suelo, Rizobacterias, Biofertilizante

Abstract

The promotion growth plant rhizobacteria, are a group of different genera of bacteria that can increase plant growth and productivity, said bacteria could be a sustainable biotechnological tool as biofertilizer and biocontroller. Isolation of rhizobacteria was carried out in soil attached to trees, mesquite (*Prosopis laevigata*) and oak (*Quercus rugosa*) native to the Guanajuato region, within the state's Natural Protected Areas. A total of 100 strains with ACC deaminase activity were obtained, of which for 50 isolates characterization, confrontation of phytopathogenic fungi tests, germination of seeds in lentil (*Lens culinaris*) were carried out. Strains 112, 255, 258 and 303 obtained positive results in all tests.

Soil, Rhizobacteria, Biofertilizer

Citación: GÓMEZ-LUNA, Blanca Estela, RAMÍREZ-GRANADOS, Juan Carlos, DÍAZ-PÉREZ, César y VELOZ-GARCÍA, Rafael Alejandro. Caracterización metabólica de cepas promotoras de crecimiento de plantas y pruebas de germinación con lenteja (*Lens culinaris*). Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales. 2018, 4-12: 10-14.

*Correspondencia al Autor (Correo electrónico: be.gomez@ugto.mx)

† Investigador contribuyendo como primer Autor.

Introducción

Rizobacterias

Las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas son un grupo de bacterias que habitan en la raíz de las plantas y suelo adherido a ésta, este espacio es conocido como rizósfera (Cassán et al., 2009). En la rizósfera se producen una variedad de ácidos orgánicos que pueden ser metabolizados por las rizobacterias. Las rizobacterias a su vez proporcionan nutrientes del suelo a la planta (Marschner, et al., 2004; Lugtenberg y Kamilova, 2009).

Este grupo de bacterias proporcionan beneficios a las plantas a través de varios mecanismos: fijación de N₂, producción de fitohormonas, solubilización de fosfatos, síntesis de enzimas como la ACC desaminasa que reduce los niveles de etileno, control biológico, producción de sideróforos, antibióticos, activación de la respuesta sistémica inducida y producción de enzimas líticas (Glick, 1995; Dobbelaere, et al., 2003; Esquivel-Cote, et al., 2013). Los productos generados por los diversos mecanismos tienen en la planta efectos directos e indirectos en el desarrollo y crecimiento como es: mejora en germinación, mayor desarrollo de la raíz, tallos, hojas y frutos o defensa contra organismos fitopatógenos (Glick, 1995; Dobbelaere et al., 2003; Esquivel-Cote et al., 2013).

De especial interés son las bacterias con actividad de ACC desaminasa ya que estas pueden disminuir el nivel de etileno en la raíz de la planta, esto por la degradación del precursor del etileno el ácido-1- aminociclopropano -1-carboxílico ACC. Las bacterias realizan este proceso por medio de la enzima ACC desaminasa que al degradar el ACC genera productos amonio y α -cetobutirato, así las bacterias adheridas a la raíz de la planta consumen el ACC y bajan el nivel de etileno asociado a señales de estrés y favorecen la elongación de la raíz (Glick, et al., 1999, Holgin et al., 2003, Esquivel-Cote et al., 2013).

El uso de las rizobacterias en plantas de importancia agronómica ha resultado en una alternativa importante a los sistemas de producción con un consumo alto de fertilizantes y agroquímicos (Grageda-Cabrera, et al., 2012; Martínez-Romero, et al., 2013).

Rizobacterias en producción de leguminosas

Dentro de las leguminosas la lenteja (*Lens culinaris*) es rica en proteína, fibra, vitaminas del complejo B y minerales como calcio y hierro, sexto lugar en la producción de granos en el mundo (Erskine et al., 2009). Las leguminosas son importantes por la capacidad de fijación de nitrógeno y mantener la fertilidad del suelo gracias a la asociación simbiótica planta- rizobio (Zahran, 2001). Sin embargo, pueden existir condiciones ambientales que afectan la formación de la simbiosis como escasas de agua, altas temperaturas en suelo dañan la planta (Nascimento, et al., 2012).

En el país Michoacán y Guanajuato son las entidades con mayor producción con 10 mil toneladas. Las leguminosas agrupan distintas especies de plantas que fijan nitrógeno atmosférico y mantienen la fertilidad de los suelos, debido a la asociación simbiótica existente con bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium*, entre otros, conocidas comúnmente como rizobios (Zahran, 2001). Factores ambientales como la sequía afectan el establecimiento de la relación simbiótica, donde la baja humedad y la alta temperatura del suelo producen daños a la planta, además de disminuir el porcentaje de sobrevivencia de la bacteria (Nascimento et al., 2012a).

Por otro lado, se ha investigado la posibilidad de incrementar la tolerancia a estrés hídrico de leguminosas y rizobios por medio de la co-inoculación con bacterias simbióticas residentes en la rizósfera, las cuales pueden promover el crecimiento radicular y producción, siendo en esos casos llamadas PGPR (del inglés plant growth promoting rhizobacteria) (Sarma y Saikia, 2014; Rashid et al., 2012).

Una de las estrategias de las PGPR para inducir la tolerancia a estrés en plantas es la producción de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminasa. De acuerdo a Penrose y Glick (2003), existen bacterias rizoféricas con un amplio rango de actividad ACC deaminasa. En tejidos vegetales, el ACC es un precursor del etileno y es sintetizado por la acción de la enzima ACC sintetasa sobre S-adenosilmetionina. Cantidades pequeñas de etileno inciden en el crecimiento vegetal ya que es la hormona relacionada con la senescencia y abscisión de las hojas, y la maduración de frutos.

Algunas PGPR de vida libre poseen la habilidad de sintetizar la enzima ACC desaminasa promoviendo el crecimiento de las plantas en condiciones de estrés, tales como: sequías, inundaciones y ataque de patógenos. En el trabajo de Sepúlveda, 2016 se evaluó el efecto en la promoción de crecimiento y nodulación con la co-inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento y rizobios en plantas de lentejas, encontraron cepas de *Pseudomonas* que ayudaron a promover la formación de nódulos. Se aplicaron las cepas promotoras de crecimiento de plantas para mejorar el porcentaje de germinación y para mejorar la formación de nodulación.

Metodología a desarrollar

Se tomaron muestras de suelo del sitio de estudio, el suelo se tomó con referencia a dos especies de árboles tomaron 2 muestras de 2 árboles mezquite (*Prosopis laevigata*) y encino (*Quercus rugosa*) con coordenadas geográficas, 20° 55' 5" latitud Norte, 100° 58' 38" longitud Oeste, con una altura promedio sobre el nivel del mar de 2160 m, en Salvatierra, Guanajuato. Las muestras de suelo se secaron a temperatura ambiente y se tamizaron, se preparó una mezcla compuesta y se tomaron 10 g, se agregaron los 10 g de suelo en 90 ml de agua se agitó por 2 h y se tomo muestra para sembrar en medio selectivo para bacterias ACC desaminasa (Penrose y Glick, 2003). Se empleó el equipo Spiral Plater Interscience en modo de siembra exponencial. Las placas se incubaron por 48 hrs a 28°C. Las cepas desarrolladas en el medio selectivo se resembraron en medio de PDA (Papa Dextrosa Agar) y se les realizó tinción de Gram.

Pruebas de germinación. Se probaron 50 cepas de los 100 aislados obtenidos, dichas cepas se inocularon en tubos falcon de 50 ml con 10 ml de extracto de papa y se agitaron por 4hrs, se llevaron a incubación a 28 °C durante 24 h. Se colocaron 25 semillas de lenteja (*Lens culinaris*) y se agitaron por 15 min. Las semillas se colocaron en cajas Petri con papel estéril humedecido, se encubaron a 28 ° C por 72 hrs. Se calculó el porcentaje de germinación, y se midió la radícula.

El diseño experimental, se prepararon cuatro tratamientos con 30 plantas cada tratamiento, los tratamientos fueron: T1: No se aplican bacterias, T2: cepa 313, T3: cepa 225 y T4: cepa 275.

Para la preparación de las cepas para inocular las plantas, cada cepa fue inoculada en medio de caldo de extracto de papa con agitación a 28°C por 24 h, la densidad del inoculo a 1×10^6 UFC/ml. Se agregaron a las plantas en la segunda semana de germinación.

Se midió el desarrollo de las plantas cada mes por tres meses y al final del experimento se determinaron las variables agronómicas: longitud, número de hojas y biomasa. Para el análisis estadístico se utilizó bloques al azar y análisis de varianza.

Resultados

Se obtuvieron 100 aislados con actividad de ACC desaminasa en medio selectivo, se seleccionaron 50 cepas para las pruebas, obteniéndose 4 cepas Gram (-) y 46 cepas Gram (+). El porcentaje de germinación obtenido de las semillas de lenteja (*Lens culinaris*) inoculadas por las cepas seleccionadas, en su mayoría fue mayor que el control, que solo se utilizó agua estéril. A las 48 hrs se obtuvieron hasta un 92% de germinación en las semillas con las cepas probadas. El control obtuvo tan solo un 64% de germinación. En dichas semillas germinadas, también se midió la radícula, presentando una diferencia significativa respecto a la longitud en las radículas del control. En la figura 1, se muestra una comparación de 10 semillas del control, respecto a la longitud de la radícula con las cepas 103 y 112.



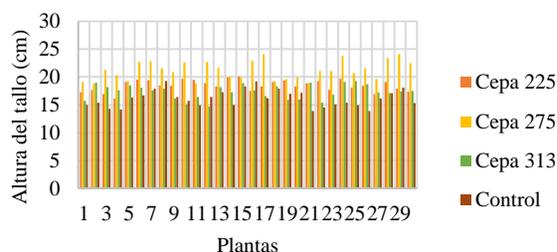
Figura 1 Comparación del tamaño de la radícula en las semillas de lenteja (*Lens culinaris*)



Figura 2 Efecto en el porcentaje de germinación en semillas de lenteja

Las semillas tratadas con las cepas de rizobacterias presentaron disminución en el tiempo de germinación, aumento en el porcentaje de germinación y mayor desarrollo de la radícula, como se muestra en la Figura 2 en las imágenes observamos una plántula trata desde semilla con la aplicación de bacteria con más desarrollo de radícula y en placa con más semillas germinadas.

Crecimiento: mes 2 Comparación de los distintos tratamientos



Crecimiento: mes 3 Comparación de los distintos tratamientos

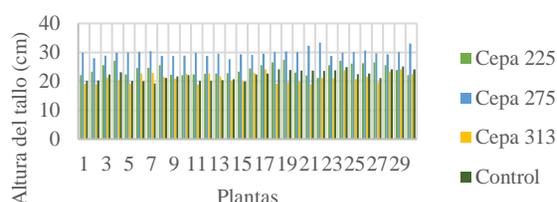


Gráfico 1 Desarrollo de las plantas con la aplicación de cepas y control por tres meses

En el gráfico 1 se muestra la cinética de crecimiento de las plantas tratadas con las bacterias con un desarrollo más rápido en cada mes de medición comparado con el control. La aplicación de las rizobacterias mostro un resultado positivo al incrementar el crecimiento de las plantas de lenteja de forma significativa comparado con el control (sin bacteria), los datos indicaron además diferencias en las capacidades de promoción de crecimiento entre las cepas utilizadas como se indica en la Tabla 1, la cepa 275 proporcionó a la planta el mejor crecimiento en altura, número de hojas y biomasa.

	Altura (cm)	Número de Hojas	Biomasa (g)
Control	22 (1.6) c	26 (4.3) d	3.8 (0.2) c
313	22 (1.0) c	39 (5.5) c	4.2 (0.2) b
225	25 (1.2) b	45 (5.5) b	4.5 (0.3) b
275	30 (1.3) a	61 (5.7) a	5.6 (0.2) a

Tabla 1 Efecto de las cepas de rizobacterias en el crecimiento de plantas de lenteja. Los valores son promedio de 30 plantas en cada tratamiento, () es desviación estándar, las letras indican diferencia entre tratamientos. Control no contiene aplicación de bacterias y 313, 225 y 275 contienen aplicación de estas cepas.



Figura 3 Efecto del uso de los aislados en el crecimiento y desarrollo de plantas de lenteja

Conclusiones

Con los resultados obtenidos se puede decir que las bacterias promotoras de crecimiento de plantas, son una herramienta biotecnológica que pudiera tener un gran impacto en producción agrícola de forma amigable con el ambiente ya que son microorganismos que promueven el crecimiento de plantas habitan de forma natural en el suelo, mejoran la salud vegetal, previenen enfermedades mediante mecanismos de defensa contra fitopatógenos, mejora en toma de nutrientes, menor gasto en uso de fertilizantes de síntesis química. Además de un mayor desarrollo de la longitud de la raíz, la formación de más microvellosidades o pelos radiculares en las raíces permite una toma de nutrientes más efectiva y adherencia al suelo. Los resultados nos indican el potencial biotecnológico que presentan estas cepas bacterianas para ser utilizadas en proyectos de mejora de producción de alimentos de forma sustentable y amigable con el suelo como fue en este trabajo con lenteja.

Referencias

Cassán, F., Perrig, D., Sgroy, V., Masciarelli, O., Penna, C. & Luna, V. (2009). *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). European Journal of Soil Biology, 45(1), 28 – 35.

Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. & Okon, Y. (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. Crit. Rev. Plant Sci. 22, 107-149.

- Esquivel-Cote, R., Gavilanes-Ruiz, M., Cruz-Ortega, R., & Huante, P. (2013). Importancia Agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en Rizobacterias, Una Revisión. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(3):251-258.
- Erskine W, Muehlbauer FJ, Sarker A, Sharma B. 2009. *The Lentil: Botany, Production and Uses*. Cabi. Preston, Lodon, UK.
- Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41:109-117.
- Glick, B.R., Patten, C.L., Holguin, O. & Penrose, D.M. 1999. Biocontrol Mechanism. Chapter 7. In: *Biochemical and genetic mechanism used by plant growth promoting bacteria*. Ontario Canada. Imperial Collage Press. pp. 215-248.
- Grageda-Cabrera, O. A., Díaz-Franco, A., Peña-Cabriales, J. J. & Vera-Núñez, A. (2012). Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 3(6): 1261-1274.
- Holguin, G., Bashan, Y., Puente, E., Carrillo, A., Bethlenfalvay, G., Rojas, A., Vázquez, P., Toledo, G., Bacilio Jiménez, M., Glick, B.R., González de Bashan, L., Lebsky, V., Moreno, M. & Hernández, J.P. (2003). Promoción del crecimiento en plantas por bacterias de la rizosfera. *Agricultura Técnica en México*. 29(2): 201-211.
- Lugtenberg, B. & Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*. 63:541 – 566.
- Marschner, P., Crowley, D.E. & Yang C.H. (2004). Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil*, 261: 199 – 208.
- Martínez-Romero, E., López-Guerrero, M.G., Ormeño-Orrillo, E. & Morales, A.C. (2013). *Manual teórico-práctico, Los Biofertilizantes y su uso en la Agricultura*. SAGARPA-COFUPRO-UNAM. 15-22.
- Nascimento F, Brígido C, Glick B, Oliveira S, Alho L. (2012a). Mesorhizobium ciceri LMS-1 expressing an exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase increases its nodulation abilities and chickpea plant resistance to soil constraints. *Lett Appl Microbiol.* 55:15-21.
- Nascimento F, Brígido C, Glick B, Oliveira S. (2012b). ACC deaminase genes are conserved among Mesorhizobium species able to nodulate the same host plant. *Microbiol Lett.* 336:26-37.
- Penrose D., Glick B. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia plantarum*. 118:10-15.
- Rashid S, Charles T, Glick B. 2012. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Appl. Soil Ecol.* 61:217-224.
- Sarma RK, Saikia R. 2014. Alleviation of drought stress in mung bean by strain *Pseudomonas aeruginosa* GGRJ21. *Plant Soil.* 377:111-126.
- Zahran HH. 2001. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *J Biotechnol.* 91:143-153.