

***Bacillus* spp. ENDÓFITOS PROMUEVEN DIFERENCIALMENTE EL CRECIMIENTO DE TRES VARIEDADES DE ZARZAMORA (*Rubus* subgénero *Eubatus*)**

Blanca Rojas-Sánchez¹, Gustavo Santoyo¹, Patricia Delgado-Valerio² y Ma. del Carmen Rocha-Granados²

RESUMEN

El género *Bacillus* produce compuestos volátiles, hormonas vegetales, polisacáridos y enzimas relacionadas con el metabolismo de los fenilpropanoides, lo que representa un alto potencial para la promoción del crecimiento vegetal. En este estudio se analizaron los efectos de compuestos difusibles y volátiles producidos por cuatro endófitos bacterianos de *Bacillus* (*Bacillus* sp. E25, *B. toyonensis* COPE52, *B. thuringiensis* UM96 y *Bacillus* sp. CR71) sobre la promoción del crecimiento de plántulas de zarzamora (*Rubus fruticosus* L.), cultivares Tupy, Kiowa y UM-13, mediante cultivo *in vitro*. Los resultados demostraron que la emisión de compuestos difusibles y orgánicos volátiles por la cepa COPE52 promovieron el aumento de la longitud y peso seco de la raíz, número de raíces y la concentración de clorofila en plántulas del cultivar Tupy. La emisión de compuestos difusibles de la cepa COPE52 indujo el aumento del peso seco de raíz y aéreo, y longitud de la raíz en el cultivar Kiowa, mientras que los compuestos volátiles emitidos por la cepa E25 promovieron incrementos en la mayoría de las variables analizadas en esta misma variedad. Los compuestos difusibles y volátiles producidos por la cepa CR71 tuvieron un mayor efecto sobre el número, longitud y peso seco de raíz en las plántulas del cultivar UM-13, mientras que la concentración de clorofila aumentó con los compuestos producidos por la cepa E-25. En conclusión, las bacterias endófitas de *Bacillus* spp. promovieron diferencialmente el crecimiento de plántulas de los cultivares de zarzamora, en función del tipo de cepa inoculada y del modo de acción de los compuestos producidos.

Palabras clave adicionales: *Bacillus*, compuestos orgánicos y volátiles, zarzamora

ABSTRACT

Endophytic *Bacillus* spp. differentially promotes growth of three blackberry varieties

The genus *Bacillus* produces volatile compounds, plant hormones, polysaccharides and enzymes related to the metabolism of phenylpropanoids, which represents a high potential for plant growth stimulation. This study analyzed the effects of diffusible and organic volatile compounds produced by four endophytic bacterial strains of the genus *Bacillus* (*Bacillus* sp. E25, *B. toyonensis* COPE52, *B. thuringiensis* UM46 and *Bacillus* sp. CR71) on the promotion of plant growth of blackberry (*Rubus fruticosus* L.) seedlings, cultivars Tupy, Kiowa, and UM-13 genotypes, growing *in vitro*. The results showed that the diffusible and volatile organic compounds produced by strain COPE52 promoted the length and dry weight of roots, numbers of roots, and chlorophyll concentration in the Tupy cultivar. The emission of diffusible compounds produced by COPE52 also promoted the roots dry weight and aerial parts, and the root length of Kiowa genotype, while volatile compounds produced by strain E25 had stimulating effects on most of analyzed variables in the same genotype. Diffusible and volatile compounds produced by strain CR71 had a major effect on number, length and dry weight of roots of the seedlings of UM-13 genotype, while the concentration of chlorophyll was increased by the same compounds produced by strain E25. Finally, endophytic *Bacillus* spp. differentially promoted plant growth of four varieties of blackberry seedlings, and their beneficial effect was strain-dependent.

Additional keywords: *Bacillus*, blackberry, diffusible and volatile compounds

INTRODUCCIÓN

México es el principal productor de zarzamora (*Rubus* subgénero *Eubatus*) a nivel mundial, y

dentro de él, el municipio de Los Reyes, Michoacán, ha aportado más del 80 % de la producción nacional (SIAP-SAGARPA, 2012-2018). En los últimos años este cultivo ha sido

Recibido: Mayo 27, 2021

Aceptado: Marzo 24, 2022

¹ Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México. e-mail: 1159358b@umich.mx; gustavo.santoyo@umich.mx

² Facultad de Agrobiología Presidente Juárez, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Uruapan, Michoacán, México. e-mail: dvalerio@umich.mx; carmen.rocha@umich.mx (autor de correspondencia)

afectado drásticamente por una serie de hongos fitopatógenos entre los que destacan *Botrytis cinerea*, *Cercospora* sp. *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *mori* (Fernández et al., 2012).

Dada las características de reproducción de la zarzamora, mediante brotes de raíz, los hongos fitopatógenos que atacan este órgano se han propagado, reproducido y establecido en las plantaciones. Es por ello que se requiere mejorar la sanidad y el desarrollo de las plantas a través de diferentes técnicas; una de ellas es el uso de organismos biológicos como son las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB, por sus siglas en inglés). Se ha comprobado que mediante la inoculación de plantas de cultivo con ciertas cepas de PGPBs en una etapa temprana de desarrollo se mejora la producción de biomasa a través de efectos directos, entre los que destacan la síntesis de hormonas y la fijación de algunos elementos minerales que ayudan a un mejor desarrollo de raíces y brotes (Saharan y Nehra., 2011; Liu et al., 2017; Elsayed et al., 2017). Las bacterias PGPBs son capaces de estimular el desarrollo de las plantas ya que poseen una serie de mecanismos complejos que interactúan entre sí para establecer relaciones benéficas, especialmente con las raíces de las plantas objetivo (Camelo et al., 2011; Lin et al., 2014).

Dentro de este grupo de PGPBs se encuentran las bacterias endófitas que se definen como aquellas que residen dentro de los tejidos vegetales de las plantas sin provocar daño aparente (Rojas et al., 2016). Entre los géneros identificados comúnmente como endófitos se encuentran *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Strenophomonas*, *Micrococcus*, *Pantoea* y *Microbacterium* (Márquez et al., 2010; Friesen et al., 2011; Xiong et al., 2014).

Los endófitos constituyen microorganismos colonizadores de plantas en una relación de simbiosis mutualista. Se encuentran en la mayoría de los ecosistemas como parte de los factores bióticos y abióticos que reducen el estrés en las plantas al estimular respuestas inmunes (Vurukonda et al., 2016; Romera et al., 2018). Uno de los mecanismos directos, que les confieren las bacterias endófitas a las plantas, es la adquisición de algunos nutrientes esenciales como el nitrógeno, fósforo y hierro; así como el modular la síntesis de los niveles de hormonas (auxinas,

citocininas y giberelinas) (Narula et al., 2013; Glick, 2015; Saini et al., 2015). Así, *Bacillus* es uno de los géneros de bacterias endófitas que provee un amplio rango de beneficios en las plantas, entre los que se encuentran la promoción del crecimiento vegetal y la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos (Lopes et al., 2018).

Los mecanismos que utilizan este tipo de bacterias para inhibir el desarrollo de los hongos fitopatógenos incluyen la síntesis y secreción de antibióticos, de enzimas del tipo proteasas y quitinasas, bacteriosinas, sideróforos, lipopéptidos y compuestos orgánicos volátiles, características que les permiten ser utilizadas en la agricultura de manera eficiente y sin daños al medio ambiente y a la salud, porque se reduce o elimina el uso de compuestos químicos sintéticos (Hernández et al., 2015; Martínez et al., 2014). *Bacillus* spp., han sido aislados de plantas como el cacao (*Theobroma cacao*), tomate (*Solanum lycopersicum*) y zarzamora (*Rubus fruticosus*) (Abbamondi et al., 2016; Contreras et al., 2016; Vera et al., 2020).

Con base en lo anterior, esta investigación tuvo como objetivo evaluar la promoción del crecimiento de plántulas de zarzamora cultivadas *in vitro* mediante la interacción con cuatro PGPBs endófitas del género *Bacillus* spp. (*Bacillus* sp. E25, *B. toyonensis* COPE52, *B. thuringiensis* UM96 y *Bacillus* sp. CR71) las cuales han sido caracterizadas por sus interacciones benéficas con plantas, entre las que destacan la producción de antibióticos, ácido indol acético y emisión de compuestos volátiles (Martínez et al., 2014; Contreras et al., 2019). Así mismo, se prevé determinar el efecto de la emisión de compuestos difusibles y volátiles emitidos por dichas cepas sobre el crecimiento radicular y la longitud de las plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Plántulas de zarzamora. Se utilizaron plántulas de zarzamora genotipos Kiowa, Tupy y UM-13; esta última se caracteriza por ser una planta productora en primocaña, es decir, son cañas del primer año que después de un periodo de latencia fructifican al año siguiente, lo que permite tener una producción en menor tiempo. Esta variedad

no posee espinas y es producto de la cruce de una selección denominada Z-21 y el genotipo Tupy, obtenida en el programa de mejoramiento genético de frutillas de la Facultad de Agrobiología Presidente Juárez de la UMSNH. Para el presente experimento todas las plántulas fueron establecidas y propagadas *in vitro* a través del método de propagación reportado por Gajdosová et al. (2006).

Crecimiento de las bacterias endófitas. Se utilizaron las cepas endófitas *Bacillus* sp. E25, *B. toyonensis* COPE52, *B. thuringiensis* UM96 y *Bacillus* sp. CR71. Para su crecimiento las cepas se inocularon en un medio nutritivo sólido (BD Bioxon) a un pH de 7 y colocadas en estufa a 28 °C por 48 horas. Posteriormente, las bacterias fueron sembradas colocando cada una de las cepas de manera independiente en un matraz estéril con el medio nutritivo líquido, por espacio de 24 horas en agitación constante de 150 rpm y una temperatura de 28 °C hasta que alcanzaron una densidad óptica de 0,5, medida con un espectrofotómetro (Jenway mod. 6305) a una longitud de onda de 540 nm.

Evaluación de promoción del crecimiento de brotes de zarzamora cultivados *in vitro*. Se utilizaron secciones de brotes apicales o axilares de los genotipos Tupy, Kiowa y UM-13, previamente establecidas y propagadas *in vitro*, las cuales fueron cortadas del ápice hacia la base del tallo a una longitud de 1,5 cm, y colocadas en frascos de cristal conteniendo medio MS básico (Murashige y Skooge, 1962) estéril. Para determinar el efecto de los compuestos difusibles sobre el crecimiento de las plántulas se tomó cada una de las cepas endófitas E25, COPE52, CR71 y UM96, previamente cultivadas en el medio nutritivo durante 24 horas en agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 por cepa, y se colocaron 100 µL de suspensión bacteriana a cada uno de los brotes. Para el caso de compuestos orgánicos volátiles los brotes se colocaron en el centro del frasco viales estériles a los cuales se había agregado 1 mL de la suspensión bacteriana. Por su parte, para los compuestos difusibles del tratamiento control, las plántulas fueron inoculadas con 100 µL de agua destilada estéril, mientras que para los compuestos volátiles el vial colocado en el centro del frasco con las plántulas contenía agua destilada estéril.

Las plántulas se mantuvieron en un cuarto de

crecimiento a temperatura de 24 °C y fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad, durante 30 días. Posteriormente se extrajeron las plántulas y con ayuda de una regla metálica se midió la altura o longitud del brote y el crecimiento de la raíz. Para determinar el contenido de clorofila se utilizó un equipo SPAD-502, usando la hoja inferior de cada una de las plántulas tanto en las plantas inoculadas con las cepas bacterianas E25, COPE52, CR71 y UM96, como en las plantas control (inoculadas con agua destilada estéril). Así mismo, se determinó el peso seco aéreo y radical, junto al número de raíces laterales.

Diseño experimental. El experimento se condujo bajo un diseño completamente al azar, donde cada unidad experimental constó de un frasco con tres brotes y siete repeticiones por tratamiento. Los tratamientos se formaron con cada uno de los genotipos de zarzamora (Tupy, Kiowa y UM-13) inoculadas con cada una de las cepas bacterianas (E25, COPE52, CR71 y UM96) y los compuestos emitidos (volátiles y/o difusibles), originando un total de 24 tratamientos y sus respectivos controles a los cuales solamente se les inoculó con el medio de cultivo nutritivo.

Análisis de datos. Los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza y prueba de Duncan ($P \leq 0,5$) para las variables que presentaron diferencias significativas. Todos los análisis se realizaron con la ayuda del paquete estadístico SAS versión 9.2 (Cary, NC, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plántulas de zarzamora *in vitro* (Tupy, Kiowa y UM-13) inoculadas con las diferentes cepas de *Bacillus* spp. (E25, COPE52, CR71 y UM96) y cultivadas en un cuarto de crecimiento en condiciones controladas, de luz y temperatura durante 30 días, mostraron los resultados que se señalan a continuación.

Promoción del crecimiento *in vitro* de plántulas de zarzamora Tupy mediante la emisión de compuestos difusibles o volátiles producidos por *Bacillus* spp. Los compuestos difusibles emitidos por las cepas E25, COPE52, CR71 y UM96 de *Bacillus* spp. sobre las plántulas *in vitro* del genotipo Tupy tuvieron efectos sobre la variable longitud de raíz, la cual se vio favorecida por los efectos de la cepa COPE52 con una

longitud de 3,14 cm, seguido de las cepas UM96 y E25 con 1,53 y 1,0 cm, respectivamente (Figura 1A), comparada con las plantas control y CR71 las cuales no presentaron raíz. Ninguna de las cepas presentó efectos de promoción sobre el crecimiento aéreo de las plántulas, e incluso, la cepa UM96 inhibió en un 56% el crecimiento con relación al testigo (Figura 1B). Por su parte, el peso seco de la raíz fue mayor en las plántulas inoculadas con las cepas COPE52, UM96 y E25, destacando las dos primeras con 0,005 g cada una

(Figura 1C). Respecto al peso seco aéreo ninguna de las cepas presentó efectos de promoción e incluso la cepa UM96 inhibió el peso en un 52,61 % con relación al control (Figura 1D). Las cepas E25, COPE52 y CR71 promovieron la concentración de clorofila de las plántulas con un incremento del 16 % en su contenido (Figura 1E), mientras que el número de raíces laterales se vio favorecido por las cepas E25, COPE52 y UM96 con 1,85; 1,76 y 1,33 unidades, respectivamente (Figura 1F).

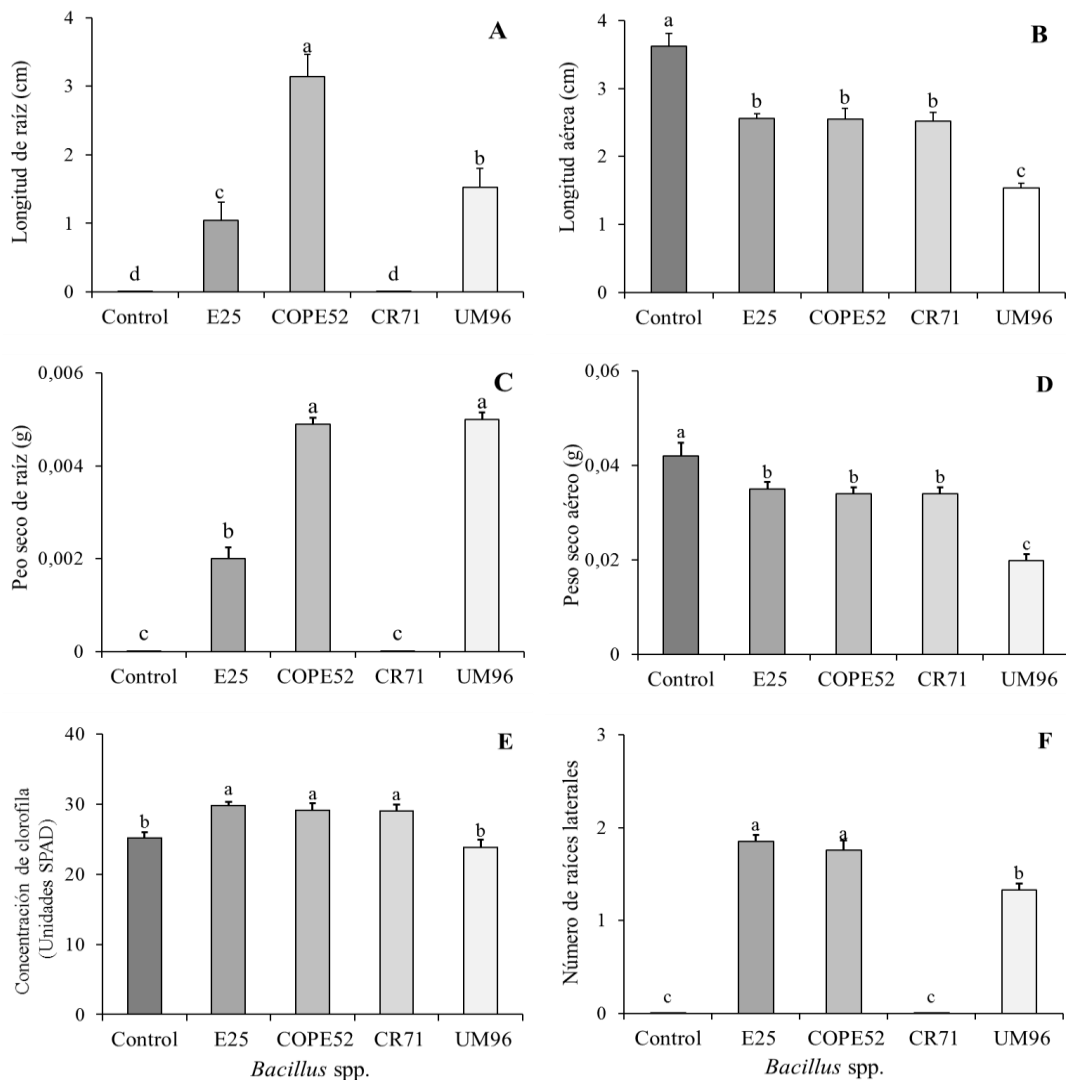


Figura 1. Efecto de la emisión de compuestos difusibles por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de *Bacillus* sobre plántulas *in vitro* de zarzamora Tupy. A) Longitud de raíz, B) Longitud aérea, C) Peso seco de raíz, D) Peso seco aéreo, E) Concentración de clorofila, F) Número de raíces laterales

Los compuestos orgánicos volátiles producidos por las cepas COPE52, E25 y CR71 de *Bacillus*

tuvieron un efecto positivo sobre la longitud de raíz de zarzamora variedad Tupy. Las plántulas

inoculadas con la cepa COPE52 presentaron una longitud de raíz de 3,03 cm seguidas por las raíces de las plántulas inoculadas con las cepas E25 y CR71 con 1,12 y 1,1 cm, respectivamente (Figura 2A), en comparación con las plántulas control y UM96 que no formaron raíz. Similar respuesta se encontró en el peso seco de la raíz en el que las cepas COPE52, E25 y CR71 tuvieron el mayor efecto con valores de 0,0037, 0,0030 y 0,0018 g, respectivamente (Figura 2C). Los compuestos volátiles producidos por las cepas bacterias no tuvieron un efecto positivo sobre las variables longitud aérea y peso seco aéreo de las plántulas,

presentando incluso valores por debajo de las plántulas control (Figura 2B,D). Las plántulas inoculadas con las cepas COPE52 y E25 presentaron mayor concentración de clorofila, con valores de 32 y 30 unidades SPAD, respectivamente (Figura 2E), mientras que las cepas CR71 y UM96 tuvieron un comportamiento similar al testigo. Las plántulas presentaron un mayor número de raíces laterales al ser inoculadas con las cepas COPE 52, CR71 y E25 con valores de 1,4; 1,1 y 1,0 raíces, respectivamente, mientras que en las plántulas control y en las inoculadas con la cepa UM96 no hubo formación de raíces (Figura 2F).

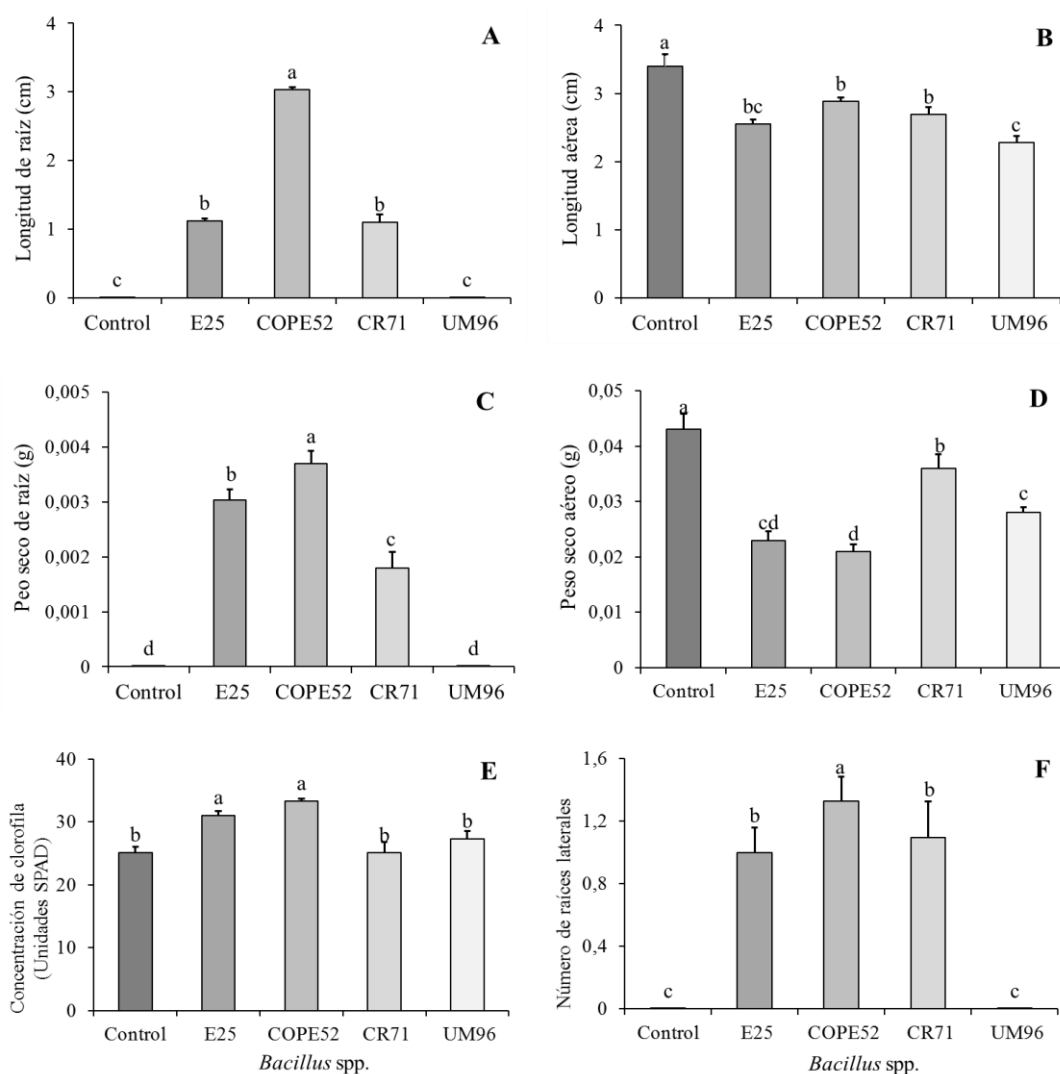


Figura 2. Efecto de la emisión de compuestos orgánicos volátiles por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de *Bacillus* spp. sobre plántulas *in vitro* de zarzamora variedad Tupy. A) Longitud de raíz, B) Longitud aérea, C) Peso seco de raíz, D) Peso seco aéreo, E) concentración de clorofila, F) Número de raíces laterales

Promoción del crecimiento *in vitro* de plántulas de zarzamora, genotipo Kiowa, mediante la emisión de compuestos difusibles y volátiles producidos por *Bacillus* spp. En la Figura 3 se presenta el efecto de la emisión de compuestos difusibles de las diferentes cepas de *Bacillus* spp. sobre la promoción del crecimiento de las plántulas de zarzamora Kiowa. Referente a la longitud radicular las cuatro cepas fueron estadísticamente diferentes respecto al control, destacando las cepas UM96 y COPE52 al inducir mayor crecimiento de raíces con longitudes de 5,02 y 4,90 cm, respectivamente (Figura 3A). Las plántulas presentaron una mayor longitud aérea

cuando se inocularon con las cepas E25, UM96 y CR71 y alcanzaron 2,84, 2,76 y 2,72 cm de longitud, respectivamente (Figura 3B). El peso seco de raíz únicamente se vio favorecido por la cepa COPE52 con un peso de 0,013 g (Figura 3C) y para el peso seco aéreo las cuatro cepas presentaron diferencias estadísticas sobre el control, destacando la cepa COPE52 con un peso seco de 0,022 g (Figura 3D). La concentración de clorofila se vio influenciada por las cuatro cepas con valores entre 40,69 y 43,43 unidades SPAD (Figura 3E). Las cepas E25 y UM96 promovieron la emergencia de raíces laterales (Figura 3F).

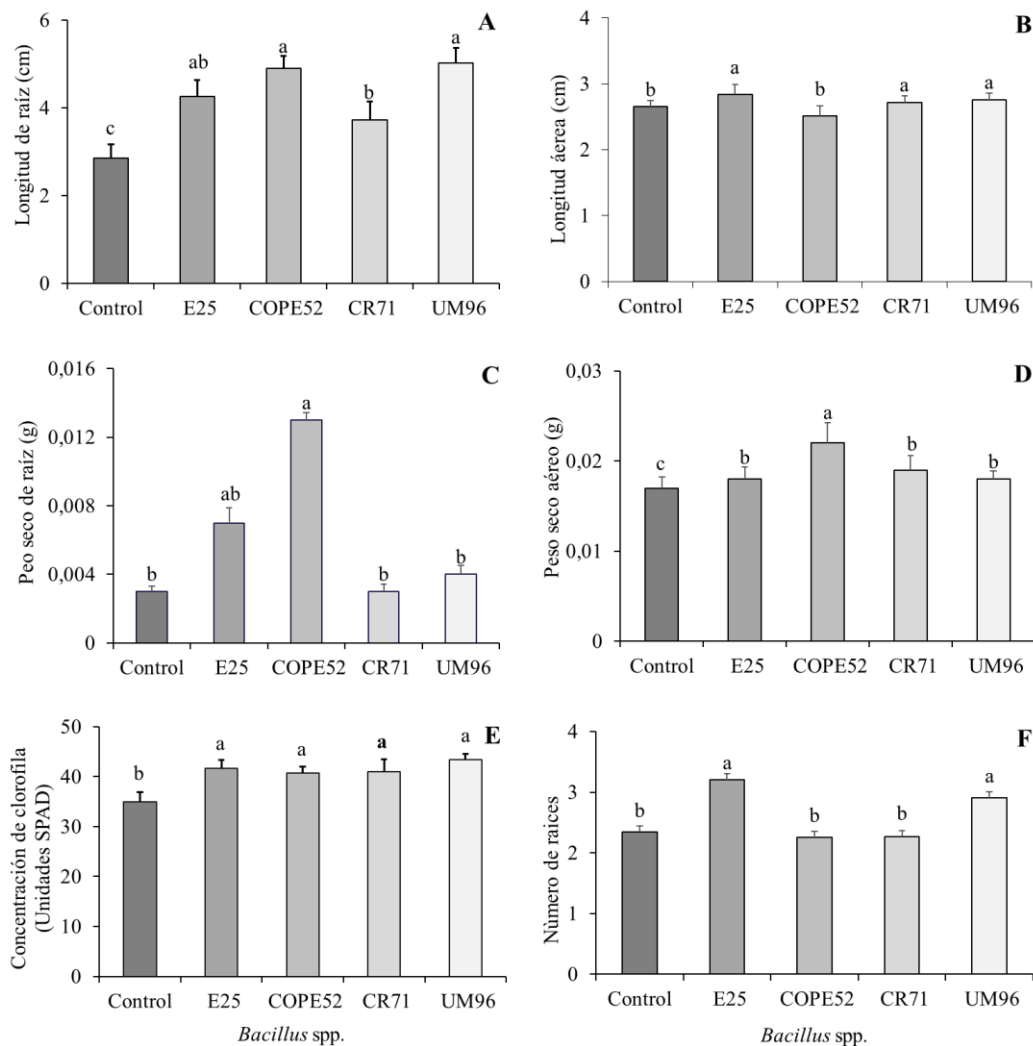


Figura 3. Efecto de la emisión de compuestos difusibles por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de *Bacillus* spp. sobre plántulas *in vitro* de zarzamora Kiowa. A) Longitud de raíz, B) Longitud aérea, C) Peso seco de raíz, D) Peso seco aéreo, E) Concentración de clorofila y F) Número de raíces laterales

En cuanto al efecto de los compuestos volátiles, producidos por las cepas de *Bacillus* spp. sobre el crecimiento de raíz de las plántulas del genotipo Kiowa, la cepa UM96 indujo la mayor longitud en las raíces de las plántulas que fueron inoculadas con ésta presentando un valor de 5,11 cm. El peso seco aéreo y de la raíz, así como la longitud aérea, fueron superiores cuando las plántulas fueron inoculadas con la

cepa E25 mostrando valores de 0,023 g, 0,0063 g y 3,0 cm, respectivamente (Figura 4 A,B,C,D). Sólo las plántulas inoculadas con la cepa UM96 presentaron diferencias estadísticas respecto al control sobre el contenido de clorofila (Figura 4E) y fueron las plántulas inoculadas con las cepas E25 y UM96 las únicas que presentaron mayor número de raíces laterales (Figura 4F).

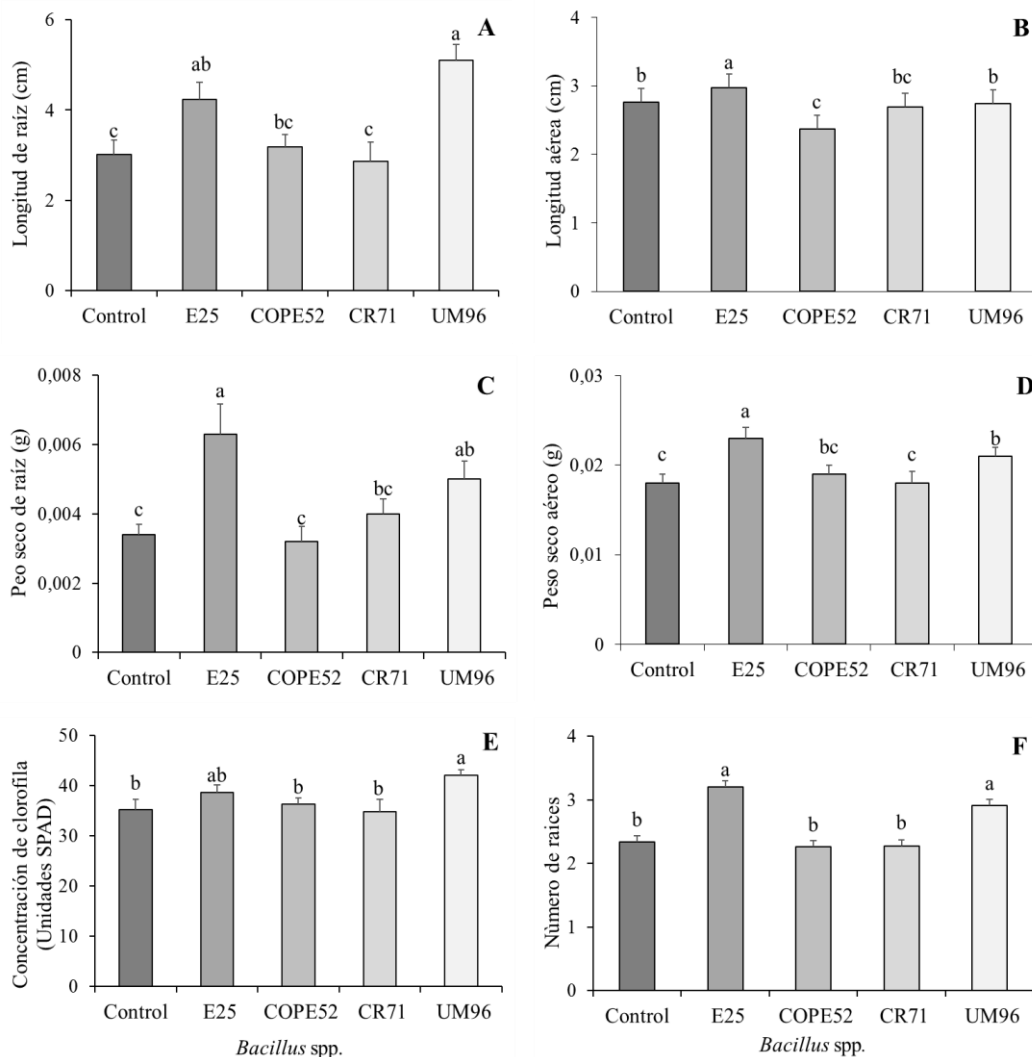


Figura 4. Efecto de la emisión de compuestos orgánicos volátiles por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de *Bacillus* spp. sobre plántulas *in vitro* de zarzamora Kiowa. A) Longitud de raíz, B) Longitud aérea, C) Peso seco de raíz, D) Peso seco aéreo, E) Concentración de clorofila y F) Número de raíces laterales

Promoción del crecimiento *in vitro* de plántulas de zarzamora UM-13, mediante la emisión de compuestos difusibles y volátiles producidos por *Bacillus* spp. Referente a la emisión de los

compuestos difusibles producidos por las cuatro cepas de *Bacillus* sp para la longitud de raíz en las plántulas de zarzamora UM-13, se observaron diferencias estadísticas respecto al control,

destacando las cepas CR71 y UM96 las cuales indujeron longitudes de raíces de 6,83 y 6,73 cm, respectivamente (Figura 5A). La longitud aérea de las plántulas fue favorecida por la cepa UM96 con 2,48 cm (Figura 5B), mientras que la cepa CR71 favoreció el peso seco de la raíz con de 0,0060 g (Figura 5C). El peso seco aéreo se vio favorecido por las cepas COPE52 y E25 (Figura 5D). Las plántulas inoculadas con la cepa E25 presentaron una mayor concentración de clorofila con 46,3 unidades SPAD, seguidas

de las plántulas que se inocularon con las cepas UM96 y COPE52 con 42,9 y 41,7 unidades SPAD, respectivamente (Figura 5E). El número de raíces laterales se vio beneficiado por las cuatro cepas del género *Bacillus* spp., destacando E25 y CR71 con 2,5 raíces laterales cada una, seguidas de las cepas UM96 y COPE52 con 1,6 y 1,3 raíces laterales, respectivamente, comparadas con las plántulas control que presentaron el menor número de este tipo de raíces (Figura 5F).

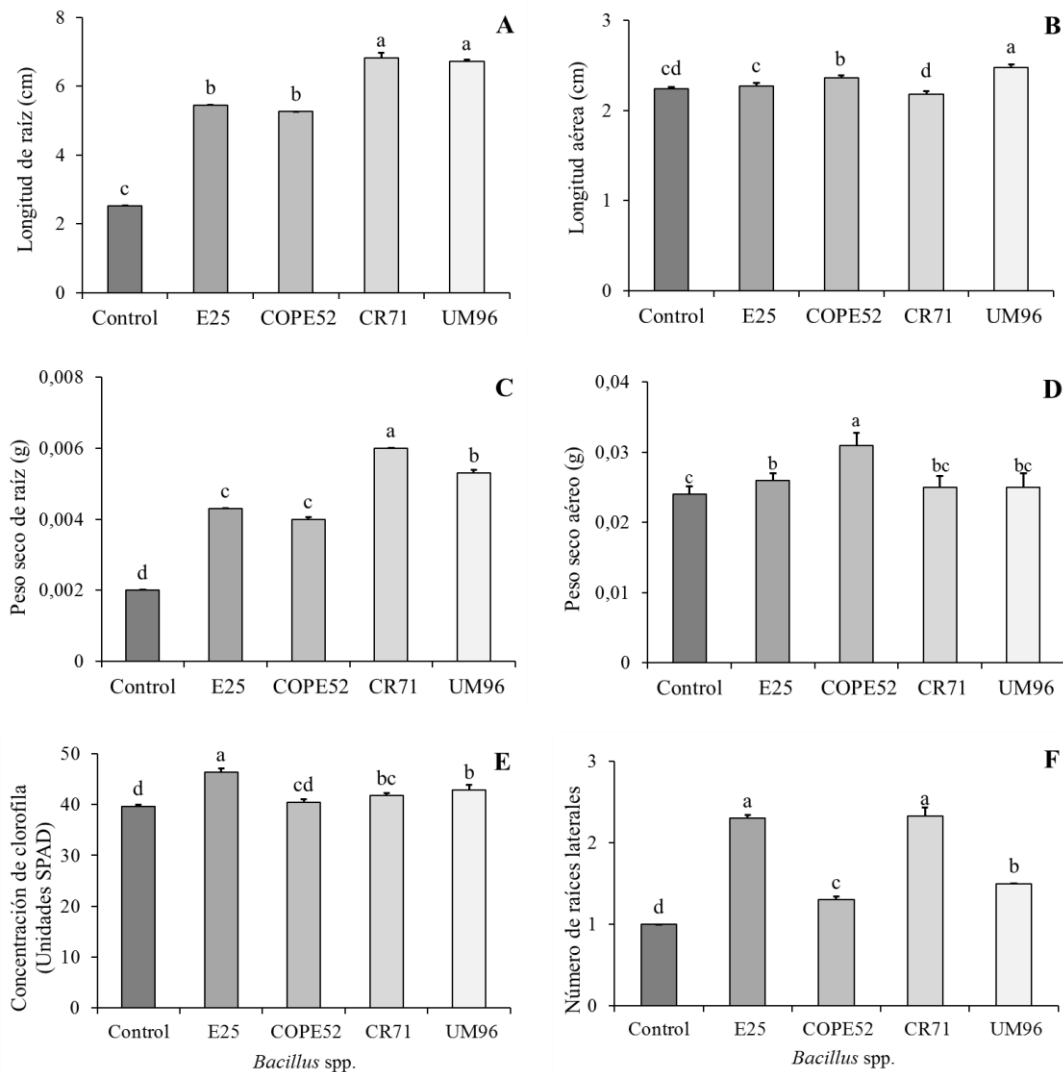


Figura 5. Efecto de la emisión de compuestos difusibles por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de *Bacillus* spp. sobre plántulas *in vitro* de zarzamora UM-13. A) Longitud de raíz, B) Longitud aérea, C) Peso seco de raíz, D) Peso seco aéreo, E) Concentración de clorofila y F) Número de raíces laterales

Las plántulas del genotipo UM-13 presentaron mejores respuestas a la emisión de compuestos

orgánicos volátiles producidos por las cepas E25, COPE52 y CR71 en comparación con las plantas

control; la cepa CR71 destacó de entre las otras por inducir la mayor longitud en raíz con 7,90 cm (Figura 6A) y junto con la cepa E25 indujeron la mayor longitud aérea con 2,53 cm cada una. Las plántulas inoculadas con la cepa COPE52 fueron estadísticamente similares al control y la UM96 resultó inferior a éste (Figura 6B). Con relación al peso seco, las plántulas inoculadas con las cepas COPE52 y CR71 presentaron un mayor peso de la raíz (0,007 y 0,0067 g, respectivamente) seguidas

por la cepa E25 (0,0048 g) mientras que COPE52 fue la única cepa que incrementó el peso aéreo (0,032 g) (Figura 6 C,D). Respecto al contenido de clorofila fueron las cepas E25 y COPE52 las que indujeron una mayor concentración en las plántulas con valores de 43,17 y 42,76 unidades SPAD, respectivamente (Figura 6E) mientras que el mayor número de raíces laterales por planta fue inducido por las cepas E25 y CR71 con valores de 1,8 raíces cada una (Figura 6F).

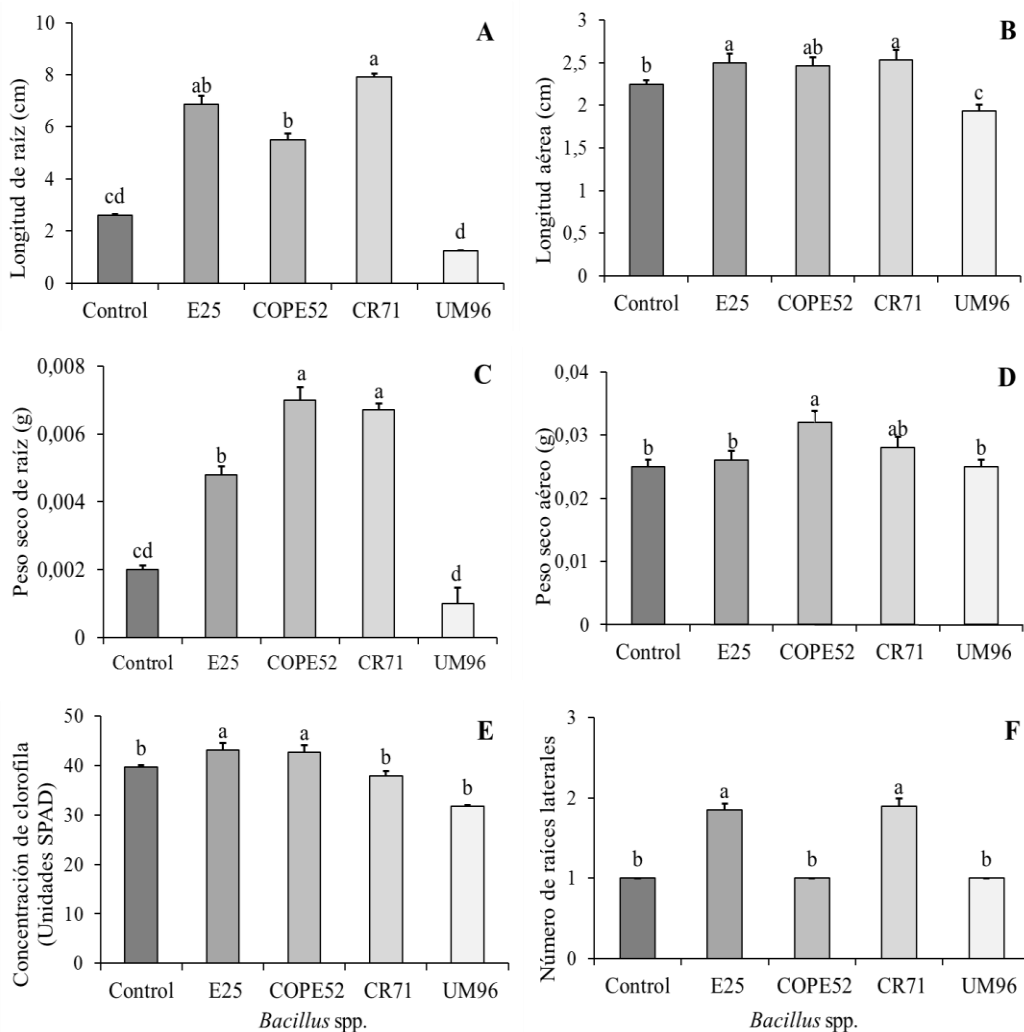


Figura 6. Efecto de la emisión de compuestos orgánicos volátiles por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de *Bacillus* spp., sobre plántulas *in vitro* de zarzamora UM-13. A) Longitud de raíz, B) Longitud aérea, C) Peso seco de raíz, D) Peso seco aéreo, E) Concentración de clorofila y F) Número de raíces laterales

DISCUSIÓN

Los resultados demuestran que el crecimiento *in vitro* de los diferentes genotipos de zarzamora

se ve influenciado por las bacterias endófitas del género *Bacillus*, las cuales promueven de manera diferencial el desarrollo y crecimiento de las plántulas de zarzamora expuestas a las cepas

bacterianas que emiten compuestos orgánicos difusibles y/o volátiles que han mostrado tener efectos sobre el desarrollo de varios tipos de plantas (Martínez et al., 2014; Rojas et al., 2018; Contreras et al., 2019). Por ejemplo, las cepas E25 y CR71 producen compuestos volátiles como la acetoina y compuestos azufrados como el dimetil disulfuro (DMDS), los cuales se han asociado con actividades promotoras del crecimiento vegetal y acción antifúngica (Rojas et al., 2018; Meldau et al., 2013). En otras cepas como *B. toyonensis* COPE52 se ha observado la producción de sideróforos, ácido indolacético y biofilm, los cuales son mecanismos de promoción del crecimiento vegetal ya que inciden en un mayor desarrollo de su sistema radicular y, por ende, mayor absorción de los nutrientes minerales, o bien en la producción de algunos antibióticos que detienen el avance o desarrollo de determinados organismos fitopatógenos (Contreras et al., 2019).

Es de destacar el hecho de que, con respecto a la emisión de compuestos orgánicos volátiles, las plántulas de la zarzamora UM-13 que fueron expuestas a la cepa UM96 presentaron siempre un crecimiento similar o menor al de las plántulas control (Figuras 6).

Una de las características más sobresalientes que presentaron las cepas E25, COPE52 y CR71 de *Bacillus* fue el ejercido sobre el crecimiento de la raíz en parámetros como longitud, número de raíces adventicias y peso seco, donde los compuestos difusibles producidos por la cepa COPE52 son los más efectivos para los genotipos Tupy y Kiowa, aunque este último cultivar también respondió eficientemente a los compuestos volátiles producidos por la cepa E25, mientras que los compuestos difusibles y volátiles producidos por la cepa CR71 tuvieron un mayor efecto sobre el cultivar UM-13. De manera similar, Rojas et al. (2018) observaron que plantas de tomate inoculadas con la cepa CR71 presentaron mayor longitud de raíz y peso de la planta, mientras que las plantas inoculadas con la cepa E25 tuvieron mayor longitud y peso de la raíz y la parte aérea de la planta en comparación con las plantas testigo.

Otro estudio comparativo es el realizado por Contreras et al. (2019), quienes encontraron que plantas de arándano (*Vaccinium* spp. variedad Biloxi) inoculadas con *Bacillus toyonensis*. cepa

COPE52, presentaron mayor longitud de raíces y brotes aéreos, y peso seco de raíz y brotes, y mayor contenido de clorofila comparadas con las plantas control. Los resultados obtenidos en nuestra investigación demostraron que para las variables longitud y peso de la parte aérea de las plántulas, los compuestos difusibles y volátiles producidos por las cuatro cepas de *Bacillus* tuvieron efectos positivos en los genotipos Kiowa y UM-13, pero no sobre el genotipo Tupy.

Otro de los mecanismos que pueden utilizar las bacterias endófitas para promover el crecimiento en las plantas es el regular la inducción de algunas hormonas vegetales y una mayor producción de clorofila (Glick, 2012). Respecto a la concentración de clorofila, las plántulas de zarzamora inoculadas con alguna de las cuatro cepas de *Bacillus* presentaron mayor concentración que las plantas control. Elsayed et al. (2017) reportan que plantas de garbanzo inoculadas con *Bacillus subtilis* BERA 71, presentan un aumento significativo en la síntesis de pigmentos fotosintéticos, incluidos clorofila a, clorofila b y carotenoides. Los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* son los más investigados y, por lo tanto, los más ampliamente utilizados en la agricultura (Babu et al., 2015). En esta investigación se observó que los compuestos difusibles y volátiles producidos por las cepas E25, CR71, COPE52 y UM96 de *Bacillus* tuvieron un efecto positivo en la mayoría de las variables medidas en las diferentes variedades de zarzamora, por lo cual sería interesante inocular plantas establecidas en campo de zarzamora variedad Tupy, que es la más utilizada en el estado de Michoacán, México, con las cepas mencionadas, para observar su efecto sobre variables como la concentración de clorofila, tamaño de fruto y concentración de sólidos solubles. También, sus interacciones con otras bacterias, pues se ha observado que la cepa UM96 puede interactuar con otras cepas rizosféricas y estimular el crecimiento de plantas de manera indirecta produciendo antibióticos que detienen el avance de algunos hongos fitopatógenos (Martínez et al., 2014).

CONCLUSIONES

La presente investigación demuestra el efecto que tienen las cepas endófitas E25, CR71,

COPE52 y UM96 de *Bacillus* sobre el crecimiento *in vitro* de tres variedades de zarzamora.

Existe una clara diferencia de la respuesta que presenta cada una de las variedades a la emisión de compuestos difusibles y/o volátiles producidos por las cepas; así, la cepa COPE52 tienen un mayor efecto sobre la longitud y peso seco de la raíz, número de raíces laterales y concentración de clorofila en el genotipo Tupy, mientras que la cepa E25 incrementa el peso seco de la raíz, longitud y peso seco aéreo, el número de raíces laterales y la concentración de clorofila mediante los compuestos volátiles en el genotipo Kiowa.

Los compuestos volátiles producidos por las cepas CR71 y COPE52 incrementaron la longitud y peso seco de la raíz, la longitud y peso seco aéreo, número de raíces y concentración de clorofila en el genotipo UM-13, parámetros que también fueron influenciados por los compuestos difusibles de todas cepas de *Bacillus* utilizadas. Finalmente, estas cepas podrían ser una alternativa sustentable para promover el crecimiento de plantas de zarzamora establecidas en campo, disminuyendo así el uso de fertilizantes químicos.

AGRADECIMIENTO

Esta investigación fue apoyada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con una beca de maestría a la M.C. Blanca Sánchez Rojas y por el Consejo de Investigación Científica (CIC)-UMSNH con el proyecto otorgado a Ma. del Carmen Rocha Granados (CIC 2019-2020).

LITERATURA CITADA

1. Abbamondi, G., G. Tommonaro, N. Weywns, S. Thijs, W. Sillen, P. Gkorezis et al. 2016. Plant growth-promoting effects of rhizospheric and endophytic bacteria associated with different tomato cultivars and new tomato hybrids. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 3: 1-10.
2. Babu, A.N., S. Jogaiyah, S. Ito, A.K. Nagaraj y L.P. Tran. 2015. Improvement of growth, fruit weight and early blight disease protection of tomato plants by rhizosphere bacteria is correlated with their beneficial trait and induced biosynthesis of antioxidant peroxidase and polyphenol oxidase. *Plant Sci.* 231: 62-73.
3. Camelo, R.M., M.S. Vera y B.R. Bonilla. 2011. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Rev. Corpoica-Ciencia Tecnol. Agrop.* 12: 159-166.
4. Contreras, M., P. Loeza, J. Villegas, R. Farias y G. Santoyo. 2016. A glimpse of the endophytic bacterial diversity in root of blackberry plants (*Rubus fruticosus*). *Genet. Mol. Res.* 15(3): 1-9.
5. Contreras-Pérez, M., J. Hernández-Salmerón, D. Rojas-Solís, C. Rocha-Granados, M.C. Orozco-Mosqueda, F.I. Parra-Cota et al. 2019. Draft genome analysis of the endophyte, *Bacillus toyonensis* COPE52, a blueberry (*Vaccinium* spp. var. Biloxi) growth-promoting bacterium. *3Biotech.* 9(10): 1-6.
6. Elsayed, F.A., A. Abdulaziz, A.H. Alqarawi, R. Ramalingam, A. Asma, O.N. Al-Huqail et al. 2017. Endophytic bacterium *Bacillus subtilis* (BERA 71) improves salt tolerance in chickpea plants by regulating the plant defense mechanisms. *J. Plant Inter.* 13(1): 33-44.
7. Fernández-Pavía, S., G. Rodríguez-Alvarado, N. Gómez-Dorantes, M.R. Gregorio-Cipriano y L. Fernández-Pavía. 2012. Enfermedades en plantas en el Estado de Michoacán. *Biológicas.* 14(2): 75-89.
8. Friesen, M.L., S.S. Poster, S.C. Stark, E.J. von Wettberg, y J.L. Sach, y E. Martínez-Romero. 2011. Microbial mediated plant functional traits. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 42: 23-26.
9. Gajdosová, A., M. Ostrolucká, G. Libiaková, E. Ondrusková y D. Simila. 2006. Microclonal propagation of *Vaccinium* sp. and *Rubus* sp., and detection of genetic variability in culture *in vitro*. *J. Fruit Orn. P. Reserch.* 14(1): 103-118.
10. Glick, B.R. 2012. Plant growth-promoting bacterial: mechanisms and applications. *Scientifica* vol. 2012. Article ID 963401, 15 p.
11. Glick, B.R. 2015. *Beneficial Plant-Bacterial Interactions*. Springer. Heidelberg, Germany.
12. Hernández-León, R., D. Rojas-Solís, M. Contreras-Pérez, M. Orozco-Mosqueda, L. Macías-Rodríguez, H. Reyes-de La Cruz et al. 2015. Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by

- Pseudomonas fluorescens* strains. Biol. Control. 181: 83-92.
13. Lin, Y., D. Du, C. Si, Q. Zhao, Z. Li y P. Li. 2014. Potential biocontrol *Bacillus* sp. strains isolated by an improved method from vinegar waste compost exhibit antibiosis against fungal pathogens and promote growth of cucumbers. Biol. Control. 71: 7-15.
14. Liu, S., H. Hao, X. Lu, X. Zhao, Y. Wang, Y. Zhang et al. 2017. Transcriptome profiling of genes involved in induced systemic salt tolerance conferred by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in *Arabidopsis thaliana*. Nat. Scient. Rep. 7: 10795.
15. Lopes, R., S. Tsui, J.R. O.P. Gonçalves y M. Vieira de Quiroz. 2018. A look into a multifunctional toolbox: endophytic *Bacillus* species provide broad and underexploited benefits for plants. World J. Microbiol. Biotechnol. 34, 94.
16. Márquez-Santacruz, H., R. Hernández-León, M. Orozco-Mosqueda, I. Velázquez-Sepulveda y G. Santoyo. 2010. Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. Genet. Mol. Res. 9: 2372-2380.
17. Martínez-Absalón, S., D. Rojas-Solís, R. Hernández-León, C. Barajas-prieto. M. Orozco-Mosqueda, J. Peña-Cabrales et al. 2014. Potential use and mode of action of the new strain *Bacillus thuringiensis* UM96 for the biological control of the grey mould phytopathogen *Botrytis cinerea*. Biocon. Sci. Technol. 34(12): 1349-1362.
18. Meldau, D., S. Meldau, L. H. Hoang, S. Underberg, H. Wünsche y I. Baldwin. 2013. Dimethyl disulfide produced by the naturally associated bacterium *Bacillus* sp. B55 promotes *Nicotiana attenuata* growth by enhancing sulfur nutrition. The Plant Cell 25(7): 2731-2747.
19. Narula, S., R.C. Anand y S.S. Dudeja. 2013. Beneficial traits of endophytic bacteria from field pea nodules and plant growth promotion of field pea. J. Food Legum. 26: 73-79.
20. Rojas-Solís, D., E. Hernández-Pacheco y G. Santoyo. 2016. Evaluation of *Bacillus* and *Pseudomonas* to colonize the rhizosphere and their effect on growth promotion in tomato (*Physalis ixocarpa* Brot. Ex Horm.). Rev. Ch. Serie Horticultura 22(1): 45-57.
21. Rojas-Solís, D., E. Zetter-Salmón, M. Contreras-Pérez, M.C. Rocha-Granados, L. Macías-Rodríguez y G. Santoyo. 2018. *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 13: 46-52.
22. Romera, F., M. García, C. Lucena, M.A. Martínez, M.A. Aparicio, J. Ramos et al. 2018. Induced systemic resistance (ISR) and Fe deficiency responses in dicot plants. Front. Plant Sci. 10: 287.
23. Saini, R., S. Dudeja, R. Giri y V. Kumar. 2015. Isolation, characterization, and evaluation of bacterial root and nodule endophytes from chickpea cultivate in Northern India. J. B. Microbiol. 55: 74-81.
24. Saharan, B.S. y V. Nehra. 2011. Plant growth promoting Rhizobacteria: A critical review. Life Sciences and Medicine Research 2: 1-15.
25. SIAP-SAGARPA (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera-Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca). 2012-2018. http://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2021/Atlas-Agroalimentario-2018. (consulta de mayo, 2021).
26. Vera-Loor, M.A., A. Bernal-Cabrera, D. Vera-Coello, M. Leiva-Mora y L. Morales-Díaz de Villegas. 2020. Identification of endophytes endospore-forming bacteria associated to *Theobroma cacao* L. in Quinde, Esmeralda, Ecuador. Cent. Invest. Agrop. 47: 63-67.
27. Vurukonda, S., S. Vardharajula, M. Shrivastava y A. Skz. 2016. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. Microbiol. Res. 184: 13-24.
28. Xiong, X., H. Liao, J. Ma, X. Liu, L. Zhang, X. Shi et al. 2014. Isolation on a rice endophytic bacterium, *P. antioea* sp. S d-1, with ligninolytic activity and characterization of its rice straw degradation ability. Lett. Appl. Microbiol. 58: 123-129.