

Inoculación de halobacterias fijadoras de nitrógeno en la contribución a tolerancia al estrés salino en frijol tepary

Prabhakaran Renganathan¹
Jesús Borboa-Flores¹
Ema Carina Rosas-Burgos¹
José Luis Cárdenas-López¹
Bernardo Murillo-Amador²
Jesús Ortega-García³
Edgar Omar Rueda-Puente^{4§}

¹Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos-Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México CP 83000. (prabhakaran.renganathan@gmail.com; Jborboaf@guayacan.uson.mx; erosass@guayacan.uson.mx; jecardena@guayacan.uson.mx). ²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC. Instituto Politécnico Nacional No. 195, Col. Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz, Baja California Sur. CP 23096, México. bemurillo04@cibnor.mx). ³Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias-Universidad de Sonora. Caborca, Sonora, México. CP 83690 (jesus.ortega@caborca.uson.mx). ⁴Departamento de Agricultura y Ganadería-Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México. CP. 83000. (erueda04@santana.uson.mx).

§Autor para correspondencia: erueda04@santana.uson.mx.

Resumen

El frijol tepary tolerante a la sequía (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) es un cultivo microbiológicamente inexplorado en regiones áridas de México donde se consume como fuente de proteína dietética. Sin embargo, la salinidad del suelo dificulta la productividad de este cultivo. El aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno halotolerantes específicas (BFN) podría ser una práctica novedosa para mejorar la tolerancia a la sal y mejorar la productividad de los cultivos. En el presente estudio, se aislaron 24 BFN de semillas de tres ecotipos de tepary expuestos a altas salinidades (0, 0.25 y 0.5 M de NaCl) *in vitro*. Se caracterizaron cepas halotolerantes fijadoras de Nitrógeno. Entre los aislados halotolerantes, sólo uno mostró alta actividad nitrogenada de 6.97 ± 1.1 nmol de cultivo h⁻¹. A partir del análisis 16S de rRNA, el microorganismo halotolerante exhibió una homología de secuencia de 99% con la bacteria conocida *Bacillus amyloliquefaciens*. Los resultados muestran que la inoculación con el aislado halotolerante identificado, tuvo efectos estimulantes sobre los parámetros de crecimiento, germinación de semillas, emergencia de semillas, longitud de brotes, longitud de raíz, biomasa, clorofila foliar y contenido de proteínas, cenizas y fibras brutas.

Palabras clave: *Azospirillum halopraeferens*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Phaseolus acutifolius*, fijación de nitrógeno, stress salino.

Recibido: enero de 2018

Aceptado: marzo de 2018

Introducción

El creciente problema del incremento de sales en las áreas de cultivo aunado a las bajas precipitaciones y altas temperaturas de ambientes árido-salinos, exige soluciones integrales para su productividad (Ungar 1982). El frijol tepary (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) es una leguminosa adaptada a las altas temperaturas y sequías del desierto de Sonora (Suroeste de los Estados Unidos de América y noroeste de México).

Las semillas de esta especie se caracterizan por un alto contenido de proteína dietética (21.1 a 32.49%) en comparación con otras especies de *Phaseolus*; por ejemplo *P. vulgaris* (19.1-29.7%), *P. lunatus* (19.7-24.9%), *P. coccineus* (20-27.4%), *P. polyanthus* (21.6-25.6%), *P. filiformis* (24.2%) y *P. Angustissimus* (25.9%) (Nabhan, 1985). En general, los rendimientos de tepary han sido estimados entre 200 y 900 kg ha⁻¹. Se han reportado rendimientos de hasta 2000 kg ha⁻¹ (Hamama y Bhardwaj, 2002; Ahmad *et al.*, 2013) dependiendo de la temporada de siembra y de la suplementación apropiada de fertilizantes nitrogenados (N).

En el noroeste de México, se aplican grandes cantidades de fertilizantes químicos a los suelos para compensar la deficiencia de N y poder incrementar los rendimientos del frijol tepary, desafortunadamente, el uso excesivo y continuo de estos fertilizantes incrementa la salinidad, afectando las propiedades físicas y químicas del suelo, que en su conjunto alteran las actividades microbianas, que podrían ser benéficas para los cultivos (Rueda-Puente *et al.*, 2003, 2007, 2010). Para reducir los aportes de fertilizantes nitrogenados con el fin de retardar o detener los aumentos adicionales en la salinidad del suelo y reducir los costos de fertilizantes, las rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas, en particular las bacterias fijadoras de N (RPCP-BFN), son una alternativa atractiva y sostenible para el cultivo de frijol tepary en suelos salinos de regiones semiáridas y áridas, como son aquellos situados en el estado de Sonora, México.

Los estudios sobre bacterias asociadas con los rendimientos de frijol tepary son escasos. Estudios relacionados con RPCP-BFN han demostrado el efecto biopromotor y bioprotector contra el estrés ambiental en las plantas, por ejemplo, la sequía, el estrés osmótico e inundación (Mayak *et al.*, 2004), temperaturas extremas (Terré *et al.*, 2007), deficiencia de nutrientes (Cassan *et al.*, 2009) y los metales tóxicos (Sandhya *et al.*, 2010; Rokhzadi y Toashih, 2011).

Durante las últimas décadas las RPCP-BFN, han sido aisladas y cultivadas como una alternativa prometedoras (Pathak y Keharia, 2013). Con base a lo anterior descrito, la hipótesis que se plantea consiste si la inoculación con RPCP-BFN, sobre todo aquellas del tipo halotolerante (HBFN) contribuyen a mejorar el efecto del estrés de salinidad en cultivos como el frijol tepary. Por lo tanto, los objetivos del presente estudio fueron: i) aislar una bacteria halotolerante fijadora de nitrógeno de rizosfera de *P. acutifolius*; y ii) identificar la contribución del aislado (*Bacillus amyloliquefaciens* RP22) sobre la tolerancia al estrés por salinidad en semillas y plántulas de *P. acutifolius*.

Materiales y métodos

Semillas

Las semillas evaluadas en el presente estudio fueron aquellos ecotipos de San Judas (SJ), Indio Yumi (IY) y Elena-Mora Property (EMP), los cuales fueron recolectadas de la sierra de Sonora-Chihuahua (29° 05' latitud norte 110° 57' longitud oeste) en el estado de Sonora.

Halobacterias fijadoras de nitrógeno

Aislamiento

Para el aislamiento de bacterias, se llevó a cabo la técnica de Rueda *et al.* (2003). Las semillas se trituraron con mortero y mortero para obtener el peso final de 4 g y las diluciones en serie (hasta 10^{-6}) en solución salina estéril al 0.85%, se sembraron sobre medio de agar OAB libre de N acorde a (Bashan *et al.*, 1993) con tres concentraciones distintas de NaCl (0, 0.25 y 0.5 M) (Rueda *et al.*, 2003), se incubaron las placas de agar a 30 °C durante cuatro días, obteniéndose 24 colonias individuales en agar, basadas en el fenotipo (color, brillo, forma, elevación y margen) según Smibert y Krieg (1994), posteriormente los aislados purificados fueron almacenados a -80 °C (glicerol al 15%).

Fijación de nitrógeno (técnica de reducción de acetileno)

El ensayo de reducción de acetileno (ERA) a las cepas seleccionadas se realizó según lo descrito por Reinhold *et al.* (1987). Los aislamientos halotolerantes se cultivaron en frascos de suero que contenían 25 ml de medio líquido OAB libre de N y NaCl 0.5 M. Los resultados se compararon con una halobacteria conocida (HBFN) *Azospirillum halopraeferens* AU10 (Reinhold *et al.*, 1987). El aislamiento que mostró la mayor actividad de reducción de acetileno fue seleccionado para su identificación genética y para realizar una evaluación adicional con ensayos de inoculación.

Identificación

La bacteria halotolerante seleccionada se identificó a nivel de género mediante secuenciación parcial de genes de rRNA 16S por Acculab, Inc. (USA). La secuencia obtenida se comparó con secuencias en la base de datos GenBank del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI) utilizando el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>; <http://www.megasoftware.net/>) y luego se depositó en el GenBank bajo el número de acceso KM652480. Además, un árbol filogenético fue construido usando MEGA6 freeware (<http://www.megasoftware.net/>).

Ensayos de inoculación-diseño del experimento

Los ensayos de inoculación se llevaron a cabo en una cámara de crecimiento y dentro de un invernadero. Ambos ensayos fueron asignados al azar en un diseño de bloque completo con un diseño trifaccional ($3 \times 3 \times 3$) = 27 tratamientos con n repeticiones; 3 ecotipos de frijol (San Judas=

SJ=, Indio Yumi =IY= y Elena-Mora Property= EMP=; 3 niveles de NaCl (0, 0.25 y 0.5 M) y 3 niveles de bacterias (Ba= *Bacillus amyloliquefaciens*, Ah= *Azospirillum halopraeferens* AU10, U= los no inoculados. Una vez semillas esterilizadas las semillas, se inocularon con la HBFN aislada y caracterizada en este estudio, usando la técnica de bomba de vacío de aire descrita por Carrillo *et al.* (1998).

Ensayos en cámara de crecimiento

La germinación de 675 semillas (25 semillas por cada tratamiento) se realizó en placas Petri esterilizadas, se sellaron con cinta de parafina para mantener las condiciones de humedad y se colocaron en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 h de luz (32 ± 0.5 °C) y 8 h de noche (25 ± 0.5 °C) con una humedad relativa de $36 \pm 1\%$ (HR). Después de 7 días, se registraron las tasas de germinación de la semilla, el crecimiento (longitud de tallo y de la raíz) y los pesos secos.

Ensayos en invernadero

Para los ensayos en el interior del invernadero, el sustrato utilizado en las macetas de plástico fue vermiculita estéril sin nutrientes. Se sembraron 540 semillas (20 semillas por cada tratamiento) en macetas y se registraron las tasas de emergencia al día 9. Las plántulas se cultivaron bajo condiciones de control con un fotoperíodo 16 h día (32 ± 0.5 °C) y 8 h noche (25 ± 0.5 °C) y con $36 \pm 1\%$ de HR. Las plantas fueron regadas cada tercer día, considerando derramar el agua para prevenir un aumento en la salinidad con las correspondientes concentraciones de NaCl y mantenerse hasta los 21 días.

Variables evaluadas

Las tasas de germinación y semillas de emergencia se calcularon utilizando la fórmula descrita por Maguire (1962): $M = n_1/t_1 + n_2/t_2 + \dots + n_7/t_7 + \dots + n_9/t_9$, donde $n_1, n_2, \dots, n_7, \dots, n_9$ son; 1 son el número de semillas germinadas; $t_1, t_2, \dots, t_7, \dots, t_9$ es el tiempo en días. El contenido de clorofila foliar se midió con un medidor de clorofila (SPAD-502, Minolta, Japón). Las longitudes de la raíz y del brote se midieron por separado con un calibrador digital (General No. 143, General Tools Manufacturing Co., Inc., Nueva York, EE. UU). Las plantas se secaron en una estufa a 110 °C durante un tiempo de 36 h para estimar el peso en seco. El método de micro-kjeldahl se empleó para determinar el N total y la proteína cruda ($N \times 6.25$), mientras que la fibra cruda y los contenidos de cenizas fueron determinados gravimétricamente (Snedecor, 1956).

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron mediante un análisis de varianza unidireccional (Andeva) seguido del ensayo de diferencia mínima significativa de Tukey cuando se observaron diferencias estadísticas. Los valores se expresan como medias \pm error estándar y los valores significativos fueron con $p \leq 0.05$.

Resultados y discusión

Halobacteria fijadora de nitrógeno

Los recuentos totales de bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) se muestran en el Cuadro 1. Se pudo apreciar que los aislados en placas de agar de control (medio de agar OAB libre de N sin NaCl) fueron de 8.6 a 12.6x 10⁶ unidades formadoras de colonias (UFC g⁻¹ y de 7.6 a 10.6x10⁶ UFC g⁻¹ para semillas con y sin testa, respectivamente. Los aislados en los ecotipos SJ y EMP disminuyeron significativamente ($p \leq 0.05$) en placas de agar suplementadas con NaCl al 0.5 y 0.75 M. En el caso de las semillas de control en el ecotipo SJ (8.3-9.3x10⁶ CFU g⁻¹), los conteos mostraron una tolerancia a NaCl de 45-54% (3.7-5x10⁶ CFU g⁻¹ semillas) y 29 - 33% (2.4-3.1x10⁶ CFU g⁻¹ semillas) de BFN cultivable total al 0.50 y 0.75 M de NaCl, respectivamente.

Cuadro 1. Unidades formadoras de colonias de HBFN asociadas a semilla de diferentes ecotipos de *Phaseolus acutifolius* sobre agar OAB libre de N suplementado con diferentes concentraciones de NaCl.

| Semillas | Ecotipos | Conteo (×10 ⁶ UFC g ⁻¹ semilla) | | | |
|------------------------|----------|---|-------------|------------|-------------|
| | | 0 M NaCl | 0.25 M NaCl | 0.5 M NaCl | 0.75 M NaCl |
| Con testa | SJ | 9.3 ±1.2a* | 8.3 ±0.6ab | 5 ±0.5bc | 3.1 ±0.5a |
| | IY | 8.6 ±2.6a | 8 ±1.1a | 5 ±1.1ab | 2.6 ±0.8ab |
| | EMP | 12.6 ±2a | 8.6 ±0.6b | 3.6 ±0.3c | 2.3 ±0.3b |
| Sin testa (endospermo) | SJ | 8.3 ±0.4a | 6.7 ±0.3b | 3.7 ±0.9c | 2.4 ±0.3b |
| | IY | 7.6 ±1.2a | 7.4 ±1.2a | 5 ±0.6ab | 3.3 ±0.4a |
| | EMP | 10.6 ±0.9a | 7.6 ±0.4b | 4.4 ±0.3c | 2.3 ±0.7b |

*= Valores representan una media ± error estandar (media de tres repeticiones). Diferente letra en la misma línea denota diferencia significativa ($p \leq 0.05$; prueba de Tukey). Ecotipos SJ= San Judas; IY= Indio Yumi; EMP= Elena-Mora Property.

De forma similar, los recuentos en el ecotipo de EMP mostraron una tolerancia a la sal 28-41% (3.6-4.4x10⁶ CFU g⁻¹ semillas) y 18-22% (2.3x10⁶ CFU g⁻¹ semillas) de BFN cultivable total a 0.5 y 0.75 M de NaCl, mientras que en el control los valores eran 10.6-12.6x10⁶ CFU g⁻¹.

Con relación a la capacidad de fijación de N (reducción de acetileno), la cepa codificada como RP22 tuvo la actividad de reducción de acetileno más alta (6.97 ±1.1 nmol cultivo⁻¹ h⁻¹), que es similar a la referencia *A. halopraeferens* AU10 (7.83 ±1.3 nmol de cultivo⁻¹ h⁻¹). Este resultado demuestra que el crecimiento mejoró en 28 y 43% con las bacterias aisladas a concentraciones de NaCl entre 0.5 M y 0.75 M NaCl.

Análogamente, Rueda *et al.* (2003) propusieron que 5% de las cepas halotolerantes de áreas salinas-planas redujeron el acetileno ~ 6.26 ±0.56 nmol de cultivo⁻¹ h⁻¹ (*Klebsiella pneumoniae*) con el control *A. halopraeferens*, lo que produjo un valor de 7.1 ±1.7 nmol⁻¹ h⁻¹. Esto podría atribuirse a la codependencia de otras bacterias, un fenómeno que es bastante común entre los microorganismos (Diby y Harshad, 2015). La identificación genética del aislado bacteriano en el presente estudio, basado en la secuencia de genes 16S rRNA, mostró una alta similitud (99%) con la bacteria promotora del crecimiento vegetal *Bacillus amyloliquefaciens* (Figura 1).

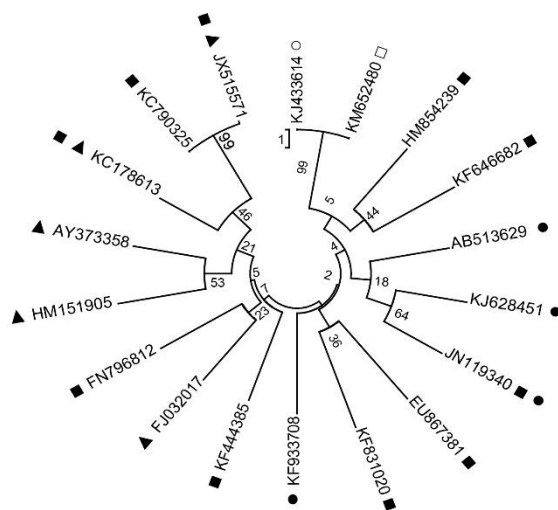


Figure 1. Árbol filogenético mostrando la similitud con el aislado *Bacillus amyloliquefaciens* RP22 (□) y la relación cercana con *Bacillus amyloliquefaciens* (○) y su relación con la halotolerante (●) fijadora de N (▲) y endófito (■) bacteria del desierto. La alineación y relación cercana con el árbol fue realizada utilizando MEGA6 (<http://www.megasoftware.net/>). Las barras indican 10% de divergencia; un análisis bootstrap fue desarrollado con 1000 ensayos. KJ433614, *Bacillus amyloliquefaciens* strain IARI-AR25; KM652480, *Bacillus amyloliquefaciens* strain RP22; HM854239, *Bacillus safensis* strain KLH-14; KF646682, *Bacillus tequilensis* strain DH-10; AB513629, *Bacillus megaterium*; KJ628451, *Bacillus subtilis* strain HPCAQRKSM106; JN119340, *Halobacillus* sp. KLBMP 2429; EU867381, *Bacillus pumilus* strain CCGE2028; KF831020, *Bacillus firmus* strain L-4; KF933708, *Bacillus baekryungensis* strain QD56; KF444385, *Bacillus aryabhatai* strain HYR8(1); FJ032017, *Bacillus pumilus* strain ES4; FN796812, *Bacillus cereus* strain GP17; HM151905, *Bacillus subtilis* strain DAZ26; AY373358.1, *Bacillus megaterium* strain c5; KC178613, *Bacillus flexus* strain DNEB39; KC790325, *Bacillus methylotrophicus* strain SY33; JX515571, *Bacillus subtilis* strain H171.

El análisis filogenético basado en el gen 16S rRNA aislado del halotolerante NFB exhibió 99% de similitud con una *B. amyloliquefaciens* (número de acceso KJ433614), una bacteria aislada del frío desierto del noroeste del Himalaya por los análisis PGPR. Hasta donde se conoce, la especie *B. amyloliquefaciens* nunca ha sido reportada para *P. acutifolius*, lo cual es indicativo de la asociación de bacterias benéficas y la planta en estudio. Otras especies del género *Bacillus* han sido aisladas e identificadas en otras leguminosas (*B. pumilus*, *B. cepacia*, *B. japonicum*, *B. vallismortis*, *B. mojavenis*, *B. atrophaeus*, *B. megaterium* y *B. Stearothermophilus*) (Bashan *et al.*, 1993; Dobbelaere y Okon, 2007ab).

Ensayos de inoculación

Cuando las semillas fueron inoculadas con cepas bacterianas, los efectos negativos del NaOCl al 2% sobre la germinación de las semillas disminuyeron (Cuadro 2). Así, se obtuvieron mayores tasas de germinación en condiciones de cámara de crecimiento con semillas inoculadas (53.3-100%) que con semillas no inoculadas (46.7-86.7%) en los tres ecotipos de frijol tepary tratados

con NaCl 0 M y 0.25 M. Además, la tasa de germinación fue fuertemente afectada cuando se aplicó NaCl 0.50 M mostrando rangos de 0-13.3% y 6.7-26.7% para las semillas no inoculadas e inoculadas, respectivamente (Cuadro 2).

Cuadro 2. Porcentajes de germinación y emergencia de semillas de tres ecotipos de *Phaseolus acutifolius* bajo cámaras de crecimiento y ensayos en invernadero.

| NaCl tratamiento | Núm. inoculado (control) | <i>B. amyloliquefaciens</i> | <i>A. halopraeferens</i> AU10 |
|-----------------------------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Germinación cámara de crecimiento | | | |
| 0 M | 46.7-86.7 | 93.3-100 | 86.7-100 |
| 0.25 M | 53.3-66.7 | 73.3-100 | 53.3-80 |
| 0.5 M | 0-13.3 | 20-26.7 | 6.7-20 |
| Emergencia en invernadero | | | |
| 0 M | 55.6-66.7 | 100 | 100 |
| 0.25 M | 22.2-33.3 | 33.3-44.4 | 33.3-44.4 |
| 0.5 M | 11.1-22.2 | 11.1-33.3 | 11.1-33.3 |

En cuanto a los parámetros medidos en condiciones de cámara de crecimiento, los tratamientos de frijol tepary en las variables de brotes y raíces en plántulas, los efectos máximos de la inoculación bacteriana con *B. amyloliquefaciens* RP22, así como *A. halopraeferens* AU10 fueron para el ecotipo SJ, mostrando resultados significativos con $p \leq 0.05$ a 0 M de NaCl (8.9 y 10.5 cm de planta⁻¹), entre 6.9 y 8.7cm planta⁻¹ para *B. amyloliquefaciens* y *A. halopraeferens* al agregar 0.25 M NaCl, en comparación con las plántulas no inoculadas que fueron más bajas: (7.8 y 8.5 y 5.8 y 6.7 cm planta⁻¹ para 0 y 0.25 M NaCl (Figura 2).

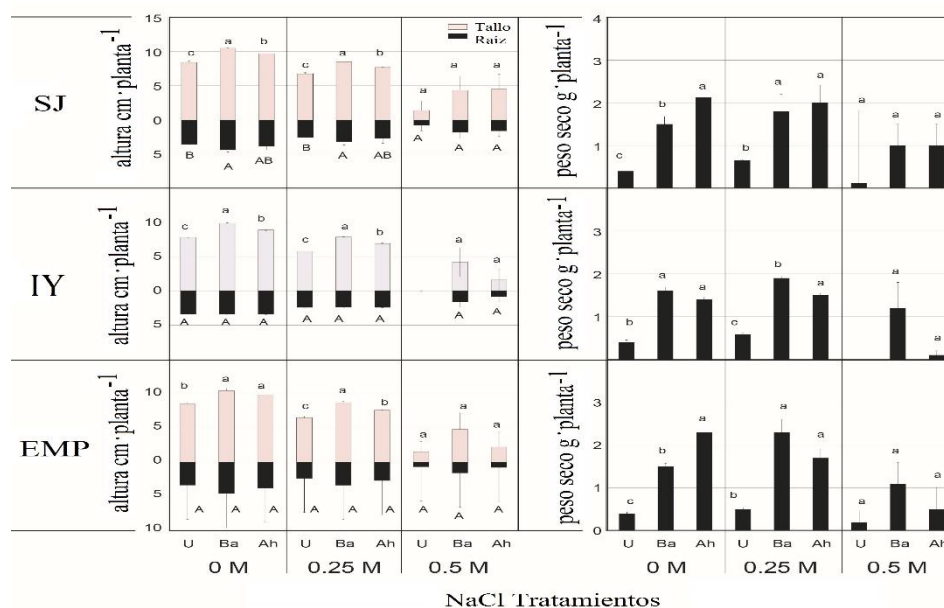


Figura 2. Efecto de las concentraciones de NaCl y la inoculación bacteriana en la altura y el peso seco de las plántulas de *Phaseolus acutifolius* en condiciones de cámara de crecimiento. Los valores representan la media \pm error estándar (n= 3). Diferente letra indica diferencias significativas ($p \leq 0.05$, prueba de Tukey) de las plantas inoculadas (Ba= *Bacillus amyloliquefaciens*, Ah= *Azospirillum halopraeferens* AU10) en relación con los controles no inoculados (U). Ecotipos SJ= San Judas; IY= Indio Yumi; EMP= Elena-Mora Property.

Las longitudes de las raíces presentaron diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) entre las plántulas inoculadas y no inoculadas en ecotipos IY y EMP, considerando todas las salinidades, excepto el ecotipo SJ donde las plantas se inocularon con *B. amyloliquefaciens* RP22, (4.4 y 2.7 cm planta⁻¹ a 0 y 2.5 M NaCl ($p \leq 0.05$)) (Figura 2).

La producción de biomasa seca según el efecto de los tratamientos fueron estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$); los incrementos en biomasa seca de las plantas inoculadas respecto a las no inoculadas fueron de 17 y 38%, respectivamente. Coincidentemente con el ensayo de cámara de crecimiento, los resultados del ensayo en invernadero (Figura 3) mostraron tasas de semilla de emergencia más bajas y valores de crecimiento y biomasa en plántulas de los tres ecotipos de frijoles tepary irrigados con NaCl al 0.25 y 0.5 M con NaCl a 0 M, este ensayo también confirma el efecto promotor del crecimiento de las plantas sobre semillas y plántulas de ambas cepas bacterianas inoculadas, lo cual reafirma la posibilidad de proponer a los microorganismos benéficos como prospectos biofertilizantes (Stefana *et al.*, 2013; Diby y Harshad, 2015).

Resultados similares indican que los efectos positivos de este tipo de bacterias aparentemente se deben a la producción de sustancias promotoras de crecimiento según lo reportado en otros estudios (Yadav, 2011; Rugheim *et al.*, 2012).

Con relación a las variables de crecimiento y de biomasa en condiciones de invernadero, se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en longitudes de brotes en el ecotipo SJ, considerando la inoculación con *B. amyloliquefaciens* RP22 (70 cm planta⁻¹), así como *A. halopraeferens* AU10 (58 cm planta⁻¹), en relación con los controles no inoculados (U) (35 cm planta⁻¹) en NaCl M (Figura 3).

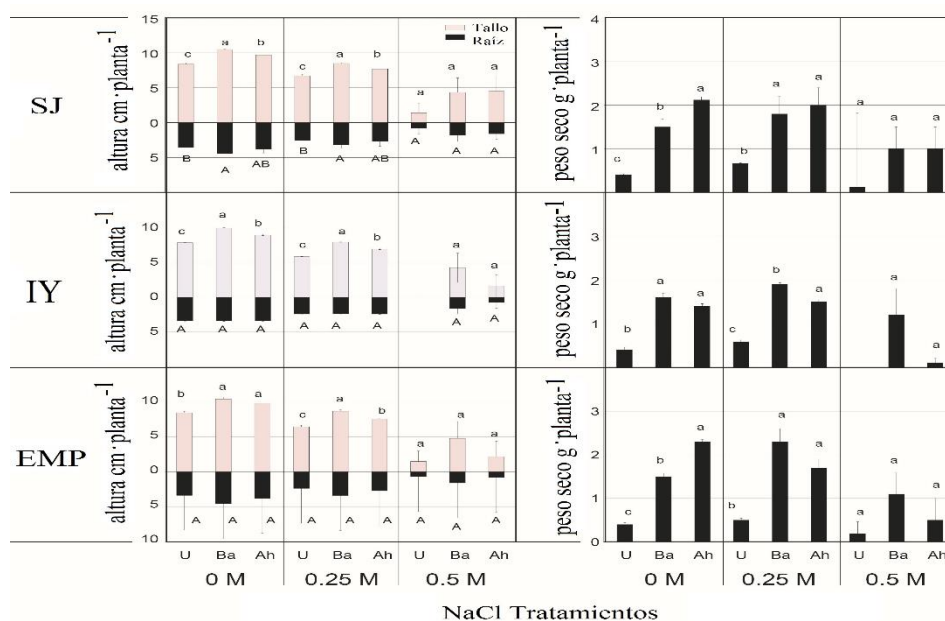


Figura 3. Efecto de las concentraciones de NaCl y la inoculación bacteriana sobre el crecimiento y el peso seco de plántulas de *Phaseolus acutifolius* bajo condiciones de invernadero. Los valores representan la media del \pm error estándar ($n = 3$). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de las plantas inoculadas (Ba = *Bacillus amyloliquefaciens*, Ah = *Azospirillum halopraeferens* AU10) en relación con los controles no inoculados (U). Ecotipos SJ= San Judas; IY= Indio Yumi; EMP= Elena-Mora Property.

En cuanto al peso en seco, los valores máximos se registraron en plántulas inoculadas en los tres ecotipos a 0, 0.25 y 0.5 M de NaCl en relación a los controles no inoculados (U). Sin embargo, cabe mencionar que la salinidad reduce el peso seco, mientras que se incrementa en todos los tratamientos (Figura 3). En particular, los valores de germinación, emergencia, crecimiento y biomasa fueron mayores en las plántulas inoculadas con *B. amyloliquefaciens* RP22 que en las inoculadas con *A. halopraeferens* AU10, particularmente en el ecotipo IY tratado con NaCl 0 y 0.25 M (Figuras 2 y 3).

Asimismo, el análisis de la clorofila foliar y los contenidos de proteínas, cenizas y fibra bruta confirman el efecto de los tratamientos con NaCl y la inoculación bacteriana en relación con los controles (no inoculados) sobre el crecimiento y la biomasa de las plántulas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de las concentraciones de NaCl y la inoculación bacteriana sobre el contenido total de clorofila, proteína, cenizas y fibra cruda en plántulas de *Phaseolus acutifolius* bajo condiciones de invernadero.

| Ecotipos | NaCl tratamientos | Inoculantes | Clorofila total | Proteína (%) | Cenizas (%) | Fibra cruda (%) |
|----------|----------------------|-------------|-----------------|--------------|----------------|--------------------|
| SJ | 0 M | U | 31.5 ±0.08b | 11.9 ±0.07b | 5.5 ±0.03b | 17.8 ±0.5b |
| | | Ba | 34.9 ±0.1a | 14.4 ±0.07a | 7.6 ±0.2a | 21.9 ±0.9a |
| | | Ah | 34.1 ±0.03a | 14 ±0.2a | 6.5 ±0.2a | 22.9 ±0.5a |
| | 0.25 M | U | 8.9 ±8.9b | 3.1 ±3.1b | 1.4±1.4b | 4.7 ±4.7b |
| | | Ba | 29.4 ±0.4a | 12.3 ±0.06a | 7.2 ±0.2a | 21.1 ±1a |
| | | Ah | 29 ±0.02a | 11.8 ±0.2a | 6.4 ±0.2a | 22.85 ±0.3a |
| | 0.5 M | U | 4.9 ±4.9c | 2.3 ±2.3b | 1 ±1b | 4.1 ±4.1b |
| | | Ba | 12.7 ±6.4a | 5.1 ±2.5a | 3.2 ±1.6a | 8.4 ±4.2a |
| | | Ah | 6.6 ±6.6b | 2.5 ±2.5b | 1.9±1.9b | 4.1 ±4.1b |
| IY | 0 M | U | 31.2 ±0.2b | 11.29 ±0.04c | 5.3 ±0.09b | 17.5±0.9b |
| | | Ba | 34.9 ±0.8a | 14.3 ±0.09a | 7.6 ±0.3a | 23.3 ±0.05a |
| | | Ah | 34.3 ±0.1a | 13.66 ±0.2b | 6 ±0.1b | 23.1 ±0.2a |
| | 0.25 M | U | 8.9 ±8.9c | 2.6 ±2.6c | 1.3 ±1.3c | 5.2 ±5.2c |
| | | Ba | 30.3 ±0.8a | 12.2 ±0.07a | 7 ±0.05a | 23.7 ±0.6a |
| | | Ah | 19.6 ±9.8b | 7.8 ±3.9b | 4.2 ±2.1b | 15.1 ±7.5b |
| | 0.5 M | U | 4.5 ±4.5b | 2.5 ±2.5a | 1 ±1a | 3.7 ±3.7a |
| | | Ba | 6.6 ±6.6a | 2.4 ±2.4a | 1.7 ±1.7a | 4.1 ±4.1a |
| | | Ah | 6 ±6a | 2.6 ±2.6a | 1.9 ±1.9a | 4.4±4.4a |
| EMP | 0 M | U | 32.5 ±0.06b | 11.5 ±0.01c | 5.6 ±0.03c | 22.4 ±0.03a |
| | | Ba | 35.2 ±0.4a | 15 ±0.2a | 8.6 ±0.4a | 23.6 ±0.03a |
| | | Ah | 34.1 ±0.03a | 14.6 ±0.4b | 6.2 ±0.06b | 23.5 ±0.19a |
| | 0.25 M | U | 9.2 ±9.2b | 3.2 ±3.2b | 1.5 ±1.5b | 7.2 ±7.2b |
| | | Ba | 29.9 ±0.2a | 12.7 ±0.2a | 7 ±0.06a | 21.8 ±0.2a |
| | | Ah | 29 ±0.02a | 12.1 ±0.03a | 6.2 ±0.2a | 22.1 ±0.1a |
| | 0.5 M | U | 5.8 ±5.8b | 2.5 ±2.5b | 1 ±1b | 4.4 ±4.4b |
| | | Ba | 18.6 ±0.61a | 7.9 ±0.03a | 5.8 ±0.4a | 13.2 ±0.6a |
| | | Ah | 19.3 ±0.6a | 7.7 ±0.1a | 5 ±0.5a | 12.6 ±0.3a |

Conclusiones

El presente estudio representa ser un primer informe de *Bacillus amyloliquefaciens* como una bacteria fijadora de nitrógeno asociada con la leguminosa *Phaseolus acutifolius*. Asimismo, es una primera aproximación en las primeras etapas bajo condiciones de salinidad, específicamente con frijol tepary, evaluando el microorganismo aislado y halotolerante comparado con un control biológico *Azospirillum halopraeferens* AU10.

La halobacteriae *B. amyloliquefaciens*, aislada a partir de semillas de ecotipos de tepary, es capaz de resistir altas concentraciones de sal (NaCl 0.75 M) y puede facilitar la promoción del crecimiento de la planta en presencia de niveles de inhibición del crecimiento de la salinidad del suelo que exceden 0.25 M NaCl.

La inoculación basada en bacterias benéficas como son las fijadoras de nitrógeno es un método biológico y confiable, para ayudar a mantener o mejorar la fertilidad de los suelos que sostienen los campos de tepary. Sin embargo, se sugiere desarrollar más evaluaciones en etapas fenológicas más avanzadas y en otros ecotipos para comprender mejor los mecanismos de acción y las reacciones particulares con cada ecotipo antes de recomendar la asociación de las bacterias a nivel de campo.

Agradecimientos

El presente estudio fue apoyado por la Institución: Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) (Proyecto No. 14651). Los autores expresan su agradecimiento a la Universidad de Sonora (UNISON) por la infraestructura y equipo proporcionado y la beca financiera parcial otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) durante los estudios de doctorado.

Literatura citada

- Ahmad, M.; Zahir, Z. A.; Khalid, M.; Nazli, F. and Arshad, M. 2013. Efficacy of *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains to improve physiology, ionic balance and quality of mung bean under salt-affected conditions on farmer's fields. *Plant Physiol. Biochem.* 63(1):170-176.
- Bashan, Y.; Holguin, G. and Lifshitz, R. 1993. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria. *In: Glick, B. R. and Thompson, J. E. (Eds.). Methods in plant molecular biology and biotechnology.* CRC Press, Boca Raton. 331-350 pp.
- Carrillo, A.; Puente, M.; Castellanos, T. and Bashan, Y. 1998. Aplicaciones biotecnológicas de ecología microbiana. *Manual de Laboratorio, Pontificia Universidad Javeriana, Santa Fe de Bogotá, Colombia and Centro de Investigaciones Biologicas del Noroeste. Manual de Laboratorio.* La Paz, Mexico. 15-20 pp.
- Cassan, F.; Maiale, S.; Masciarelli, O.; Vidal, A.; Luna, V. and Ruiz, O. 2009. Cadaverine production by *Azospirillum brasiliense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. *Eur. J. Soil Biol.* 45(1):12-19
- Diby P. and Harshad, L. 2015. Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: a review. *Agron. Sustainable Develop.* 34(4):737-752.

- Dobbelaere, S. and Okon, Y. 2007a. The plant growth promoting effects and plant responses. *In*: nitrogen fixation: origins, applications and research progress. Newton, W. (Ed.). Vol V: associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations. Elmerich, C. and Newton, W. E. (Eds.). Springer, Heidelberg. 145-170 p.
- Dobbelaere, S. and Okon, Y. 2007b. The plant growth promoting effect and plant responses. *In*: Elmerich, C. and Newton, W. E. (Eds.). Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. 1-26 pp.
- Hamama, A. A. and Bhardwaj, H. L. 2002. Tepary bean: a short duration summer crop in Virginia. *In*: Janick, J. and Whipkey, A. (Eds.). Trends in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria. 429-431 pp.
- Stefana, M.; Neculai, M.; Vasile, S.; Marius, M. and Lucian, H. 2013. Seed inoculation with plant growth promoting rhizobacteria enhances photosynthesis and yield of runner bean (*Phaseolus coccineus* L). *Sci. Hortic.* 151(28):22-29.
- Mayak, S.; Tirosh, T. and Glick, B. R. 2004. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiol. Biochem.* 42(6):565-572.
- Nabhan, G. P. 1985. *Gathering the Desert*. University of Arizona Press, Tucson, USA. 24-35 pp. ISBN 13: 9780816509355.
- Pathak, K. V. and Keharia, H. 2013. Application of extracellular lipopeptide biosurfactant produced by endophytic *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) in microbially enhanced oil recovery (MEOR). *Biotech.* 4(1):41-48.
- Reinhold, B.; Hurek, T.; Fendrik, I.; Pot, B.; Gillis, M.; Kersters, K.; Thielmans, S. and De Ley, J. 1987. *Azospirillum halopraeferens* sp. novo, a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* L. Kunth). *Inter. J. System. Bacteriol.* 37(1):43-51.
- Rokhzadi, A. and Toashih, V. 2011. Nutrient uptake and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) inoculated with plant growth-promoting rhizobacteria. *Austr. J. Cop Scii.* 5(4):44-48.
- Rueda, P. E.; Castellanos, T.; Troyo, D. E.; Díaz de León, Á. J. and Murillo, A. B. 2003. Effects of a nitrogen-fixing indigenous bacterium *Klebsiella pneumoniae* on the growth and development of the halophyte *Salicornia bigelovii* as a new crop for saline environments. *J. Agron. Crop Sci.* 189(5):323-332.
- Rueda, P. E. O.; García, H. J. L.; Preciado, R. P.; Murillo, A. B.; Tarazón, H. M. A. and Flores, H. A. 2007. Germination of *Salicornia bigelovii* ecotypes under stressing conditions of temperature and salinity and ameliorative effects of plant growth-promoting bacteria. *J. Agron. Crop Sci.* 193(3):167-176.
- Rueda, P. E. O.; Murillo, A. B.; Castellanos, C. T.; García, H. J. L.; Tarazón, H. M. A.; Moreno, M. S. and Gerlach, B. L. E. 2010. Effects of plant growth promoting bacteria and mycorrhizal on *Capsicum annuum* L. var. aviculare ([Dierbach] D'Arcy and Eshbaugh) germination under stressing abiotic conditions. *Plant Physiol. Biochem.* 48(8):724-730.
- Rugheim, A. M. E. and Abdelgani, M. 2012. Effects of microbial and chemical fertilization on yield and seed quality of faba bean (*Vicia faba*). *Int. Food Res. J.* 19(3):417-422.
- Sandhya, V.; Ali, S. Z.; Grover, M.; Reddy, G. and Venkateswarlu, B. 2010. Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. *Plant Growth Regulation.* 62(4):21-30.
- Smibert, R. M. and Krieg, N. R. 1994. Phenotypic characterization. *In*: Gerhardt, P.; Murray, R.; Wood, W. and Krieg, N. (Ed.). *Methods for general and molecular bacteriology*. ASM Press, Washington, DC. 615 p.

- Snedecor, G. 1956. Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology. The Iowa State College Press, Ames, Iowa, USA. 237-290 pp.
- Terré, S.; Asch, F.; Padham, J.; Sikora, R. A. and Becker, M. 2007. Influence of root zone bacteria on root iron plaque formation in rice subjected to iron toxicity. *In*: Tielkes, E. (Ed.). Utilisation of diversity in land use systems: sustainable and organic approaches to meet human needs. Tropentag, Witzenhausen, Germany. 446 p.
- Ungar, I. 1982. Germination ecology of halophytes. *In*: Ungar, I. (Ed.). Tasks for vegetation science, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 143-154 pp.
- Yadav, B. K. 2011. Interaction effect of phosphorus and sulphur on yield and quality of cluster bean in typic Haplustept. *World J. Agric. Sci.* 7(1):556-560.