

EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL SOBRE LA GERMINACIÓN DE

Salicornia bigelovii

Effect of Inoculation of Plant Growth Promoting Bacteria on Germination of *Salicornia bigelovii*

Edgar O. Rueda-Puente^{1‡}, Jorge A. Villegas-Espinoza², Luis E. Gerlach-Barrera¹,
Mario A. Tarazón-Herrera¹, Bernardo Murillo-Amador³, José Luis García-Hernández⁴,
Enrique Troyo-Diéguez³ y Pablo Preciado-Rangel⁵

RESUMEN

Salicornia bigelovii es una halófito que puede producir aceite y alimentos para consumo humano y animal. Sin embargo, su productividad depende de la aportación suplementaria de nitrógeno. Aunque la fertilización con nitrógeno incrementa el rendimiento en suelos salinos, también tiene el potencial de incrementar la salinidad del suelo. Existe el potencial de utilizar microorganismos benéficos halotolerantes como bacterias promotoras del crecimiento (BPCP), para mitigar la salinización y promover el crecimiento de *Salicornia bigelovii*. El objetivo del presente estudio consistió en evaluar el efecto de la inoculación de dos halobacterias BPCP: *Azospirillum halopraeferens* (Ah) y *Klebsiella pneumoniae* (Kp), en semillas de cuatro ecotipos de *S. bigelovii*: Santa Rosa Grande (SRG), Santa Rosa Chica (SRCH), Santa Cruz (SC) y Cerro Prieto (CP), sometidas a tres concentraciones de salinidad (0.0, 0.25 y 0.5 M de NaCl). Los resultados indican un porcentaje mayor de germinación en ausencia de NaCl, sobresaliendo los ecotipos inoculados. Se encontró que, conforme

la salinidad se incrementa, Kp es particularmente efectiva en aumentar el peso fresco y seco de plántula de SRCH y CP. El presente estudio muestra que la inoculación con *Klebsiella pneumoniae* puede promover la germinación de algunos ecotipos de *Salicornia bigelovii*. Se recomiendan estudios de seguimiento para determinar si los efectos observados de BPCP en la germinación pueden traducirse en una mayor producción del cultivo.

Palabras clave: *alófito, halobacterias, microorganismos benéficos.*

SUMMARY

Salicornia bigelovii is a halophyte that can produce oil, food and feed. However, its productivity depends on supplemental nitrogen fertilization. Although nitrogen fertilizer will increase yield in saline soils, it also has the potential to increase soil salinity. There is potential to use beneficial microorganisms as plant growth-promoting bacteria (PGPB) to mitigate salinization and improve the growth of *Salicornia bigelovii*. This study monitored the effects of inoculation of two halobacteria PGPB: *Azospirillum halopraeferens* (Ah) and *Klebsiella pneumoniae* (Kp) in seeds of four ecotypes of *S. bigelovii*: Santa Rosa Grande (SRG), Santa Rosa Girl (SRCH), Santa Cruz (SC) and Cerro Prieto (CP), subjected to three concentrations of salinity (0.0, 0.25 and 0.5M NaCl). The results indicated a higher percentage of germination in the absence of NaCl, especially in the inoculated seeds. It was found that, as salinity level increased, Kp was particularly effective in increasing the fresh weight and dry weight of SRCH and CP seedlings. This study shows that inoculation with *Klebsiella pneumoniae* can enhance the germination of some ecotypes of *S. bigelovii*. We recommend

¹ Universidad de Sonora, Departamento de Administración Agropecuaria. Carretera Internacional y Avenida 16 de Septiembre s/n, Col. La Loma. 84600 Ciudad Santa Ana, Sonora, México.

[‡] Autor responsable (erueda04@santana.uson.mx)

² Universidad Autónoma de Baja California. Ejido Nuevo León. 21705 Mexicali, Baja California, México.

³ Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo de Santa Rita. Apartado Postal 128, 23090 La Paz, Baja California Sur, México.

⁴ Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Agronomía y Zootecnia. Constitución 404 Sur. Zona Centro. 34000 Durango, Durango, México.

⁵ Instituto Tecnológico de Torreón. Km 7.5 Carretera Torreón San Pedro. Apartado Postal 42, 27070 Torreón, Coah., México.

follow-up studies to determine whether the observed effects of PGPB on germination, can render increased crop production.

Index words: *halophyte, halobacterium, beneficial microorganism.*

INTRODUCCIÓN

El exceso de sales ejerce gran influencia en el crecimiento de las plantas. Los suelos salinos se encuentran principalmente en zonas de clima árido o semiárido. En este tipo de regiones, las sales solubles no pueden ser transportadas muy lejos, no solamente porque hay menor precipitación para lavarlas y transportarlas, sino también como consecuencia de la elevada evaporación característica del clima árido, que las concentra en los suelos y en el agua superficial. Algunas especies de halófitas de alta productividad, presentan un gran potencial económico para utilizar los suelos ensalitrados del desierto y zonas costeras con fines agrícolas. Muchos productos agrícolas generados por los cultivos convencionales, podrían obtenerse de las halófitas. *Salicornia bigelovii* es una halófito que crece naturalmente a en las costas del Pacífico de México y algunos científicos mexicanos se han interesado en su estudio para cultivarla en regiones costeras áridas y semiáridas por su utilidad agroindustrial principalmente para la producción de aceites vegetales, alimentos de consumo humano como ensaladas y como forraje. *Salicornia*, presenta una gama de ecotipos con variación fenotípica que se demuestra por su abundancia y distribución, lo cual favorece su posible reproducción. Sin embargo, para desarrollarla como monocultivo requiere de una aplicación química nitrogenada que varía entre los 1000 a 1500 kg ha⁻¹ distribuidos en tres etapas de su fenología (Mota, 1980; Mota, 1990; Mota, 1996; Mota, 1999). Altas aplicaciones de fertilizantes químicos traen como consecuencia una gran salinización de los suelos agrícolas de zonas áridas como lo son los de la zona del noroeste de México (Mota, 1996). Una alternativa es la aplicación de bacterias promotoras de crecimiento en plantas, las cuales tienen la particularidad de fijar el nitrógeno atmosférico además de producir o actuar como inductores en la síntesis de fitohormonas, en las que figuran las auxinas y giberelinas (AG₃) que promueven la germinación, floración y fructificación de las plantas. Estudios relacionados con la interacción de *Salicornia bigelovii* y bacterias promotoras

de crecimiento de plantas se reducen a tres estudios (Bashan *et al.*, 2000; Rueda *et al.*, 2003, 2004). El objetivo del presente estudio consistió en evaluar el efecto de la inoculación de las halobacterias promotoras de crecimiento: *Azospirillum halopraeferens* y *Klebsiella pneumoniae* en la etapa de germinación, en cuatro ecotipos de *Salicornia bigelovii*, que se desarrollan de manera natural en las costas del estado de Sonora.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio Agrícola "Dr. Felix Ayala Chairez" de la División de Ciencias Administrativas, Contables y Agropecuarias de la Universidad de Sonora, Campus Santa Ana.

Obtención y Selección de Semilla y Bacterias

Se colectaron semillas de plantas maduras de cuatro ecotipos de *Salicornia bigelovii*, que se desarrollaron en forma natural en el año 2005 procedentes de las siguientes regiones costeras del estado de Sonora: Estero Santa Rosa Grande (ESG), Estero Santa Rosa Chica (ESCH), Estero Santa Cruz (ESC) y, Estero Cerro Prieto (ECP). Las bacterias *Azospirillum halopraeferens* y *Klebsiella pneumoniae*, fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología Ambiental del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR).

La colecta de semillas se realizó seleccionando plantas maduras y secas de las poblaciones anteriormente citadas. Posteriormente las semillas se cernieron utilizando una maya de 0.5 mm de diámetro. Se escogieron las semillas de mayor tamaño (0.6 mm de longitud), con uniformidad de color y que correspondiera a cada ecotipo y sin daños aparentes. Se utilizó un diseño estadístico completamente al azar con un arreglo factorial con tres factores (4 x 3 x 3): ecotipos; NaCl (0.0, 0.25 y 0.5 M) y bacterias (*Azospirillum halopraeferens* y *Klebsiella pneumoniae*) y un control sin inocular. Se consideraron cinco repeticiones de 50 semillas por repetición por tratamiento: 36 tratamientos con cinco repeticiones cada uno; un total de 180 unidades experimentales. Posteriormente las semillas se depositaron en recipientes con agua potable por una hora y se desecharon aquellas que flotaron (Murillo *et al.*, 2000). Se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante tres minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces para eliminar

los excesos de cloro (Carrillo *et al.*, 1998; Rueda *et al.*, 2003).

Crecimiento de las Bacterias

El crecimiento de los microorganismos en estudio: *Azospirillum halopraeferens* y *Klebsiella pneumoniae*, se llevó a cabo en un medio de cultivo sin fuente enriquecida de nitrógeno Renie (Rennie, 1981) y utilizando un matraz de un litro. Posteriormente se depositó en cada uno de los matraces 1 mL de las bacterias (cada una por separado) y se dejó transcurrir un período de 16 horas de crecimiento cinético bacteriano, límite para obtener células bacterianas maduras. Se transfirieron 10 mL de cada una de las bacterias por separado a un tubo de 20 mL y se centrifugó a 7938 g durante 10 minutos, se extrajo el pelet bacteriano y fue vertido en 10 mL de solución salina al 0.85% para resuspender el botón celular (pelet bacteriano). Se resuspendió el botón y se midió la densidad óptica a 540 nm haciendo uso de un espectrofotómetro. La lectura considerada de densidad óptica fue de uno, lo que nos indica que la muestra del inóculo tiene aproximadamente 10^9 unidades formadoras de colonias (UFC mL⁻¹). Se transfirió 1 mL, del inóculo ajustado, a un tubo de ensayo con 9 mL de solución salina al 0.85% para obtener una dilución de 10^7 UFC mL⁻¹ (Carrillo *et al.*, 1998).

Inoculación en Semilla

La inoculación se llevó a cabo utilizando la técnica denominada al vacío como lo describe Carrillo *et al.* (1998), que consiste en el uso de una bomba al vacío. Grupos individuales de 50 semillas de cada ecotipo, al cabo de 24 horas después de la desinfección, se colocaron en un matraz de 500 mL, posteriormente se añadieron 100 mL de medios enriquecidos con bacterias con una concentración de 10^7 UFC mL⁻¹. Después los matraces con semilla y medio bacteriano se sometieron a la acción del vacío (600 mm Hg) durante 5 minutos. Cada uno de los grupos de semillas (50) con su respectivo tratamiento (ecotipo-bacteria-salinidad), se depositaron en cajas Petri previamente esterilizadas que presentaban una esponja de sostén.

Condiciones In Vitro

Las cajas Petri se ubicaron en una incubadora a 25 °C, durante 24 días; cada una de las cajas de cada

ecotipo se irrigó de manera inicial con 25 mL y utilizando un atomizador se dieron 10 aplicaciones diariamente durante el transcurso del estudio. La germinación se llevó a cabo en condiciones de oscuridad continua.

Variables Evaluadas

El porcentaje de germinación se obtuvo examinando las cajas Petri al final del estudio (24 días) (Murillo *et al.*, 2000). La tasa de germinación, que es la suma de semillas germinadas en un lapso, se contabilizó diariamente durante los cuatro primeros días, y después cada tercer día. La tasa de germinación y el porcentaje se evaluaron mediante la observación de la emergencia de la radícula (2 mm de longitud). El número de semillas germinadas se realizó mediante lecturas diarias (tasa de germinación) y finalmente el porcentaje de germinación se determinó a los 24 días. La tasa de germinación se calculó de acuerdo a Maguire (1962) con la ecuación: $M = n_1/t_1 + n_2/t_2 + \dots + n_{24}/t_{24}$. Donde n_1, n_2, \dots, n_{24} representan el número de semillas germinadas en el tiempo t_1, t_2, \dots, t_{24} (en días). Utilizando el mismo diseño descrito, se realizaron análisis de varianza del porcentaje de germinación transformando previamente los valores con arcoseno (Sokal y Rohlf, 1988). La tasa de germinación, que es la suma de semillas germinadas contadas por día también se analizó. La diferencia significativa entre las medias de los tratamientos se evaluó mediante la prueba de Rango Múltiple de Duncan al 0.05%. Los datos se analizaron utilizando el programa de cómputo SAS (SAS, 2001). La longitud radicular y altura de plántula, se midieron con un vernier. Para conocer el número de bacterias adheridas a la raíz, se tomaron cinco plántulas por repetición y se agitaron durante 10 segundos en tubos de ensayo en una solución salina estéril de 0.85% de NaCl. De la suspensión se tomó 0.1 mL y se sembró en estría al cuadrante en cajas Petri con medio de cultivo de bacterias Renie. Las mismas se incubaron durante 36 horas a una temperatura de 28 °C. Las colonias de bacterias existentes se cuantificaron con un contador manual. Para el pesado en fresco se utilizó una balanza analítica, considerando cinco plántulas por repetición; finalmente éstas se introdujeron en una cámara de secado a 80 °C y se pesaron nuevamente. Se realizó un análisis de varianza (Snedecor, 1956) para peso fresco, peso seco, longitud de plántula y longitud de raíz, así como las unidades formadoras de colonias por mL (UFC mL⁻¹). La diferencia mínima significativa se realizó mediante una Prueba de Rango Múltiple de Duncan al 0.5%.

Las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación de Ecotipos de *Salicornia bigelvii*

Con la inoculación, el ecotipo Cerro Prieto (CP) presentó el mayor porcentaje de germinación (100%) sin presencia de NaCl, seguido de los ecotipos Santa Rosa Chica (SRCH), Santa Rosa Grande (SRG) y Santa Cruz (SC) con un 42, 27.6 y 25.2% respectivamente (Figura 1). Los mismos ecotipos al hacer uso de la inoculación, con las bacterias (Ah y Kp), se observó que mostraron un mejor comportamiento al ser inoculados con Ah que con Kp (Figura 1); los valores obtenidos con Kp (SRCH = 40.8%, SRG = 37.6%, SC = 36.8% y CP = 100) se mostraron superiores a los ecotipos no inoculados, excepto SRCH que generó un valor de 1.2% menor al ser inoculado en comparación del control. A una salinidad de 0.25 M NaCl la germinación de los ecotipos se comportó diferente respecto a los que no tuvieron NaCl (considerando los no inoculados y los inoculados). En los ecotipos no inoculados se inhibió la

germinación en tres de ellos (SRCH, SRG y SC en 72, 68 y 117% menor que a los tratamientos sin NaCl), mientras que el ecotipo CP tratado con Ah y Kp, siguió mostrando el 100% de germinación (Figura 2). No obstante esto último, a 0.25 M de NaCl, se observó que el tratamiento sin inoculantes también mostró un 100% de germinación (Figura 2). Con 0.5 M de NaCl, el porcentaje de germinación en CP siguió mostrando los mismo valores altos (100%) que a 0 y 0.25 M de NaCl; asimismo se logró observar un ligero decremento no significativo en el mismo ecotipo CP sin inoculante (Figura 3). Es importante indicar que aquellos ecotipos (SRCH + Ah y SC + Ah) a 0% M de NaCl, mostraron los valores más altos de germinación en comparación con 0.25 M de NaCl; excepto SRCH que se comportó mejor con Ah a 0.25 M de NaCl (Figura 2 y 3). Los resultados de la inoculación concuerdan con Bashan y Holguin (1997), donde indican que el uso de bacterias induce a la germinación, debido a la síntesis de fitohormonas liberadas. Otro de los factores observados en el presente estudio y del cual, otras investigaciones resaltan (Besnier, 1988; Camacho, 1994) es la inhibición de la germinación por efecto de algunos factores abióticos como temperatura, humedad, luz y salinidad.

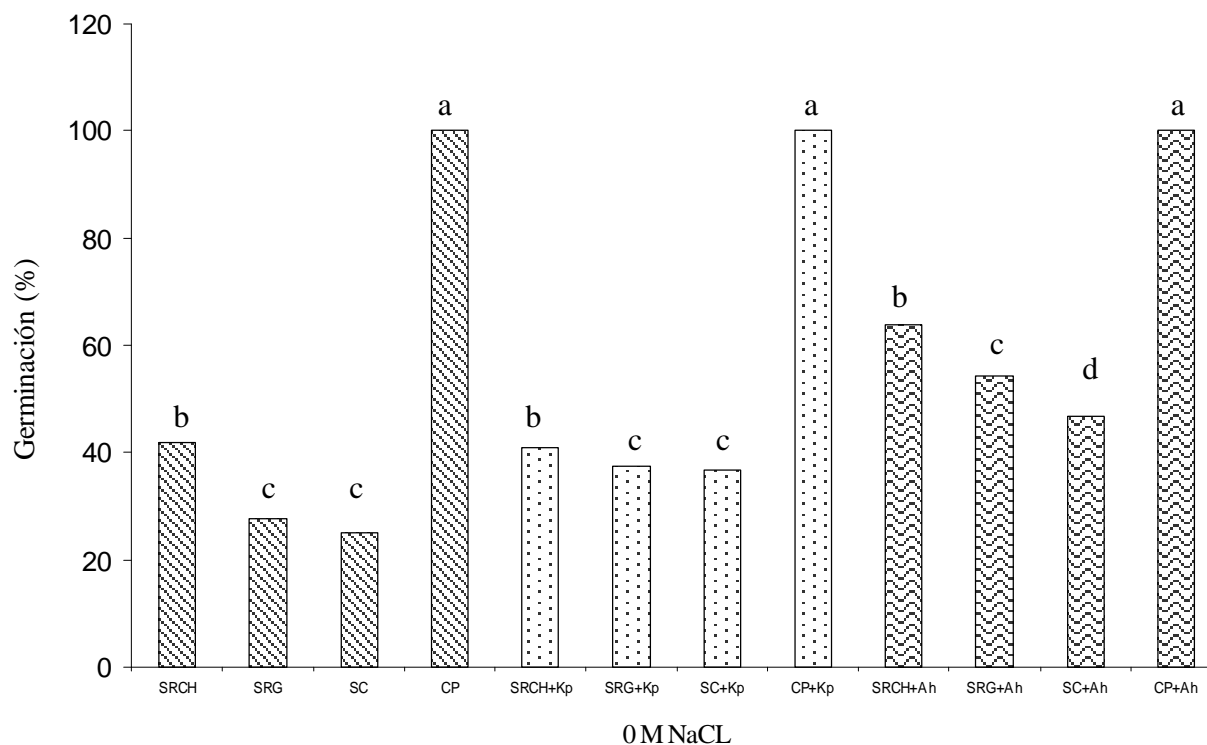


Figura 1. Porcentaje de germinación de ecotipos de *Salicornia bigelovii* (SRCH = Santa Rosa Chica, SRG = Santa Rosa Grande, SC = Santa Cruz y CP = Cerro Prieto), inoculados con las bacterias: Kp = *Klebsiella pneumoniae* y Ah = *Azospirillum halopraeferens* sin NaCl. Las letras indican diferencias significativas, Duncan con $P \leq 0.05$.

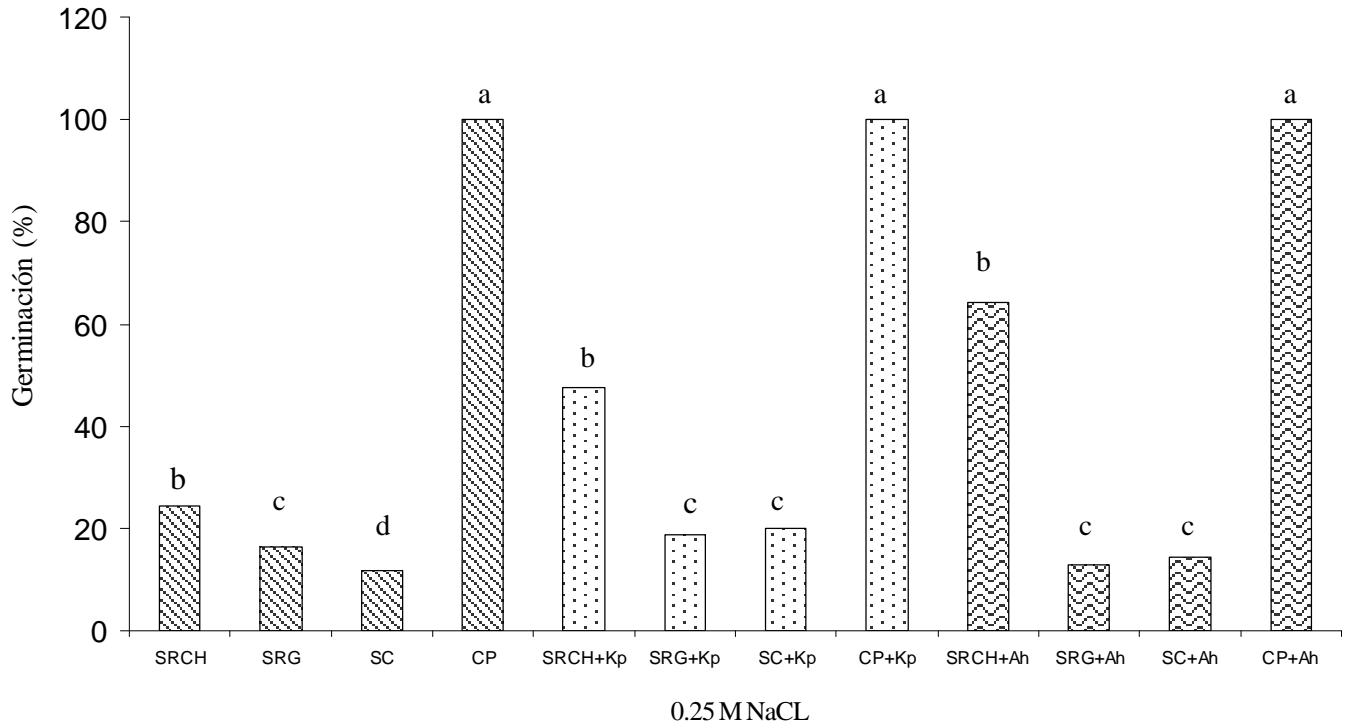


Figura 2. Porcentaje de germinación de ecotipos de *Salicornia bigelovii* (SRCH = Santa Rosa Chica, SRG = Santa Rosa Grande, SC = Santa Cruz y CP = Cerro Prieto), inoculados con las bacterias: Kp = *Klebsiella pneumoniae* y Ah = *Azospirillum halopraeferens* a 0.25 M de NaCl. Las letras indican diferencias significativas, Duncan con $P \leq 0.05$.

Este último es un factor importante que no permite a los ecotipos de *Salicornia bigelovii* germinen adecuadamente conforme la salinidad se incrementa (Ungar, 2000; Allison *et al.*, 1980).

Tasa de Germinación de Ecotipos de *Salicornia bigelovii* con la Inoculación

El ecotipo CP alcanzó la máxima tasa de germinación (50 semillas) a los 10 días en comparación con los restantes (Figura 4). En los tratamientos con el inoculante Kp sin NaCl, el ecotipo que mejor se comportó fue CP, ya que presentó una tasa de germinación de 50 semillas al octavo día después de la inoculación (48 h por arriba en comparación con los tratamientos sin inocular). Por otra parte, en los otros tratamientos con el inoculante Ah, el ecotipo CP siguió mostrando alta tasa de germinación. Sin embargo, ésta fue alcanzada a los 14 días de la inoculación. También se observó una tendencia donde CP, CP + Ah y CP + Kp mostraron los valores máximos, en comparación de los demás tratamientos sin NaCl.

La tasa de germinación a 0.25 M de NaCl, el ecotipo CP, resultó superior ya que al octavo día germinaron 50

semillas, siguiéndole en segundo plano los ecotipos de SRCH, SRG y SC. Por su parte, aquellos tratamientos inoculados con Kp, mostraron una tasa de germinación similar a los tratamientos no inoculados. Resultando de igual forma ser CP el mejor ecotipo. Con el inoculante Ah a 0.25 M de NaCl, el ecotipo CP presentó una alta tasa de germinación de 50 semillas al octavo día después de la inoculación en comparación con los ecotipos Santa Rosa Chica, Santa Rosa Grande y Santa Cruz. Respecto a la respuesta de tasa de germinación a 0.5 M de NaCl, el ecotipo CP resultó superior en la tasa de germinación con 49 semillas germinadas a los 12 días después de la siembra, en comparación de los restantes ecotipos. A esta misma salinidad, los tratamientos inoculados con Kp, los resultados indican que CP presentó su máxima tasa de germinación al octavo día. Al realizar el análisis de los ecotipos con la inoculación de Ah a una salinidad de 0.5 M NaCl, el ecotipo que presento mejor tasa de germinación fue CP (10 días). El presente estudio indica que ambos genotipos son beneficiados por *K. pneumoniae* y *A. halopraeferens*. Resultados similares se han obtenido para otras plantas (Puente *et al.*, 1999; Rozema *et al.*, 1975; Goodfriend *et al.*, 2000) y aunque los ensayos se hayan efectuado con otras plantas y otros

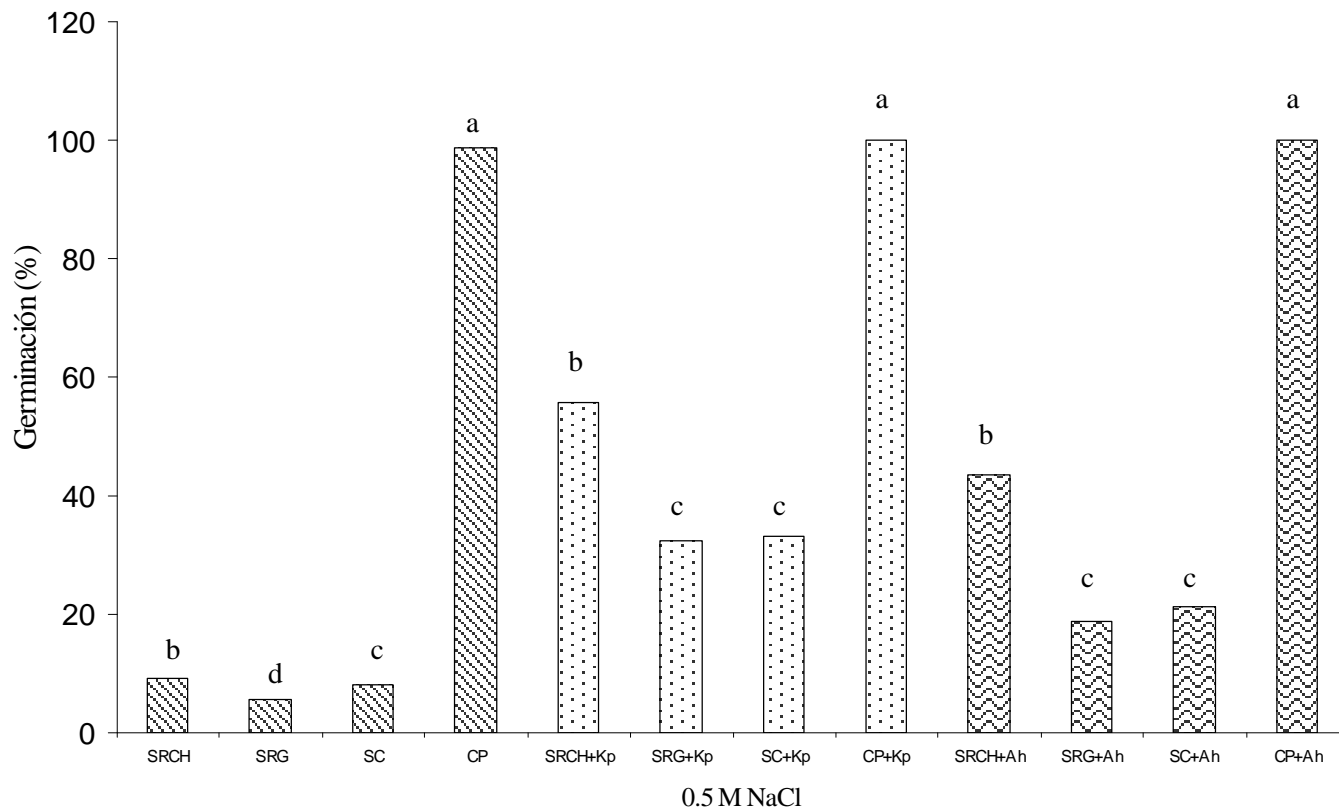


Figura 3. Porcentaje de germinación de ecotipos de *Salicornia bigelovii* (SRCH = Santa Rosa Chica, SRG = Santa Rosa Grande, SC = Santa Cruz y CP = Cerro Prieto), inoculados con las bacterias: Kp = *Klebsiella pneumoniae* y Ah = *Azospirillum halopraeferens* a 0.5 M de NaCl. Las letras indican diferencias significativas, Duncan con $P \leq 0.05$.

microorganismos benéficos, algunos inhiben los efectos sobre la germinación (Díaz *et al.*, 2001). Sin embargo, la mayoría muestra efectos positivos con este tipo de microorganismo (Arsac *et al.*, 1990) que también coinciden con los resultados del presente estudio. Los efectos positivos de estas bacterias observados en el presente estudio aparentemente se deben a la producción de sustancias promotoras de crecimiento según lo reportado en otros estudios (Arsac *et al.*, 1990; Haahtela *et al.*, 1990; El-Khawas y Adachi, 1999) donde el efecto en la tasa y porcentaje de germinación se manifiesta de manera positiva ya que intrínsecamente se incrementa la tasa de división celular (mitosis) (Fallik, *et al.*, 2000).

Altura de Planta y Longitud Radicular de Ecotipos de *Salicornia bigelovii*

La altura de los ecotipos con una salinidad de 0 M de NaCl, CP + Kp presentó los valores mayores (49.2 mm) en comparación de CP+Ah y CP en el testigo

con 48.7 y 48.1 respectivamente. Respecto a la longitud radicular, el mismo ecotipo CP + Ah (60.7 mm) mostró valores superiores en comparación con CP + Kp y CP (49.25 y 48.1 mm respectivamente, sin embargo, comparado con los restantes tratamientos mostraron diferencia significativa (Figura 5).

Los resultados obtenidos a 0.25 M de NaCl, indican que entre los tratamientos no inoculados, CP sobresalió en altura y longitud radicular (46.85 y 61.9 mm, respectivamente) en comparación de los demás ecotipos. Sin embargo, con aquellos que se inocularon con Kp, los ecotipos CP y SRCH fueron los que presentaron una mayor altura, (46.35 y 19.5 mm) en comparación de SRG y SC (6.35 y 7.15 mm respectivamente). En longitud radicular, CP y SRCH fueron superiores (62.5 y 27.15 mm). A una salinidad de 0.5 M de NaCl, el ecotipo CP en la altura y longitud radicular (inoculados y no inoculados) manifestó ser superior en comparación de los demás ecotipos. En altura (entre los no inoculados) CP mostró un 900% en comparación con SRCH. Al comparar los tratamientos con aquellos inoculados

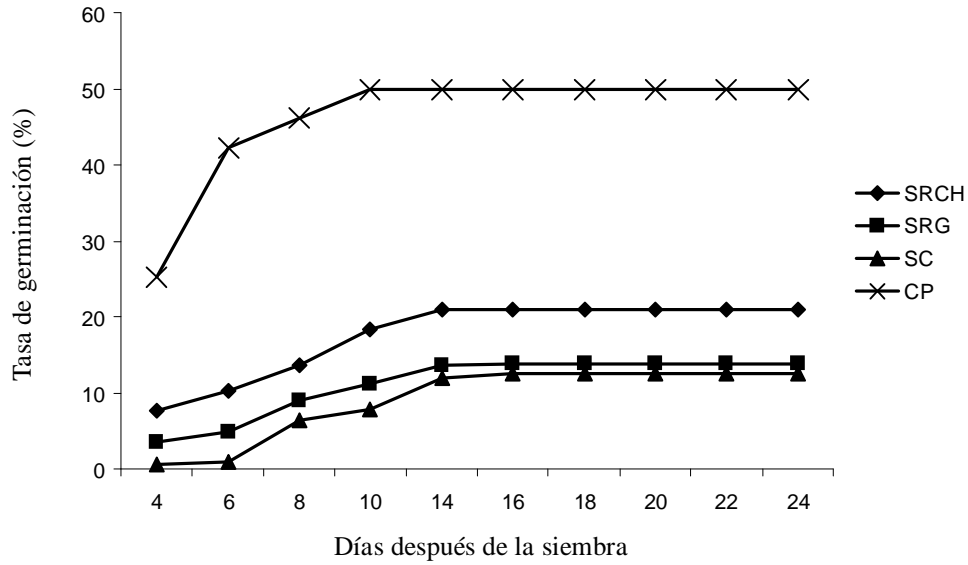


Figura 4. Tasa de germinación de ecotipos de *Salicornia bigelovii* (SRCH = Santa Rosa Chica, SRG = Santa Rosa Grande, SC = Santa Cruz y CP = Cerro Prieto), sin la inoculación de bacterias a sin NaCl.

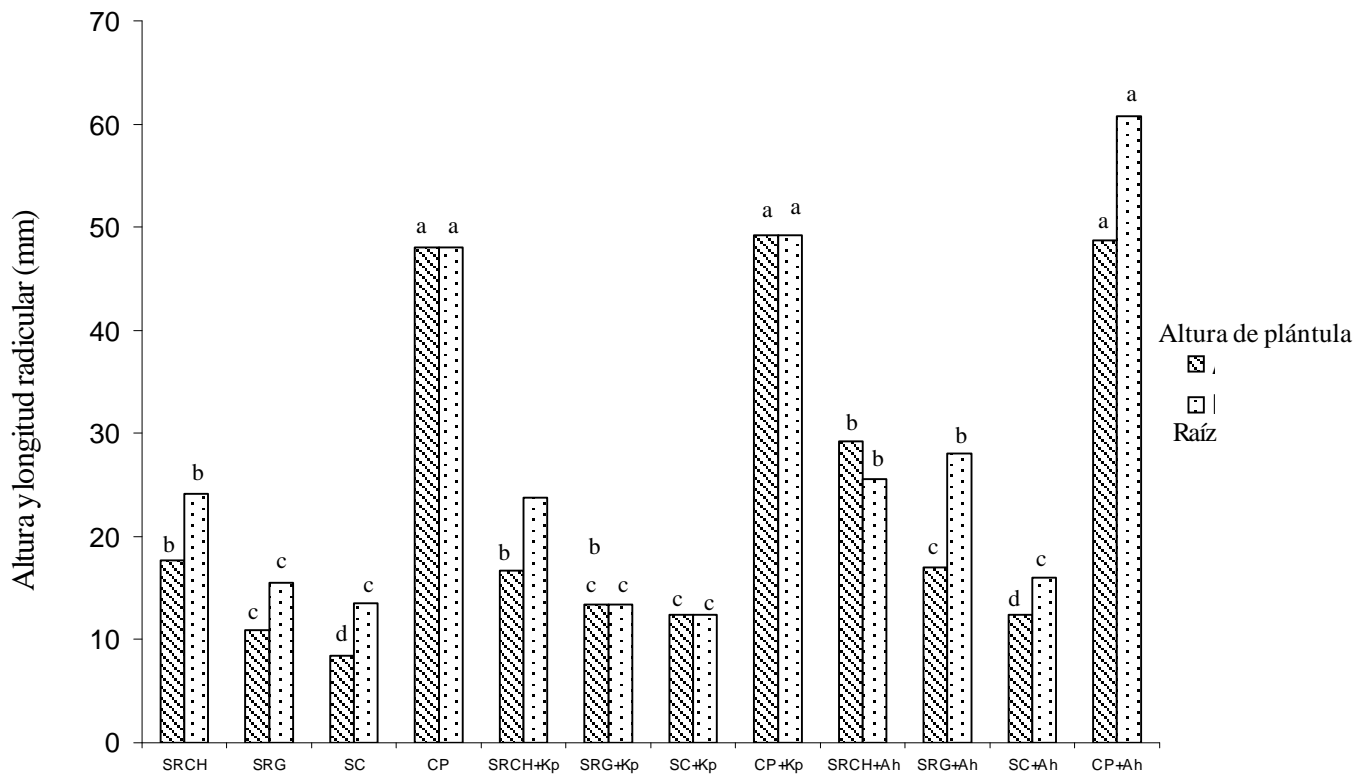


Figura 5. Altura de plántula (mm) y longitud radicular (mm) de ecotipos de *Salicornia bigelovii* (SRCH = Santa Rosa Chica, SRG = Santa Rosa Grande, SC = Santa Cruz y CP = Cerro Prieto), inoculados con las bacterias: Kp = *Klebsiella pneumoniae* y Ah = *Azospirillum halopraeferens* a 0 M de NaCl. Las letras indican diferencias significativas, Duncan con $P = 0.05$.

por Kp, CP + Kp fue superior en un 218% con relación a SRCH + Kp. En la inoculación de Ah, de igual forma CP + Ah, fue 2.6 veces mayor que SRCH. En longitud radicular, el ecotipo CP también se comportó positivamente en comparación con los demás tratamientos. Según datos obtenidos de la investigación, los ecotipos CP con las bacterias Ah y Kp se ven claramente el desarrollo en altura y longitud radicular que se tuvieron en las tres salinidades y además en los demás ecotipos mencionados. Estas características de bacterias corresponden a lo dicho en Lira (2003), que han sido caracterizadas en la interacción de plantas y microorganismos donde indican que las auxinas, citocininas y giberelinas producidas por los microorganismos, así como la inducción de las mismas en órganos vegetativos como son las semillas en este caso donde han exhibido propiedades fuertes de regulación del crecimiento y cada uno con su estructura particular y activos a muy bajas concentraciones dentro de la planta (Lira, 2003).

Peso Fresco y Seco de Plántula de Ecotipos de *Salicornia bigelovii*

En la variable peso seco, considerando los tratamientos, sin inoculantes sin NaCl, el ecotipo que presentó los valores máximos fue SRCH ($P \leq 0.05$). Sin embargo, a 0.25 M de NaCl, SRCH numéricamente

es favorecida cuando es inoculada con Kp y Ah. Un similar comportamiento se observó con SRCH a 0.5 M de NaCl.

En la variable peso fresco el ecotipo SRCH sigue mostrando los valores más altos en comparación con los demás tratamientos y se puede observar que sobresale cuando es inoculada con Kp sin presencia de sales. No obstante lo anterior, a 0.25 M de NaCl el ecotipo CP es el que ofrece resultados significativos, sobre todo cuando se utiliza a Kp como inoculante; un similar comportamiento es visualizado a 0.5 M de NaCl con CP, pero inoculado con Ah (Cuadro 1).

Los resultados anteriores indican que ambas bacterias promueven la germinación en los ecotipos de *Salicornia bigelovii*, posiblemente debido a la capacidad de las bacterias para producir y estimular la síntesis de compuestos hormonales como las giberelinas GA_3 , que son mencionadas por otros autores (Reinhold *et al.*, 1987; Haahtela *et al.*, 1990). Los resultados sugieren que la especie de *Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens* pueden influir en las plantas, por lo que es importante continuar con la búsqueda de este tipo de microorganismos; asimismo, los datos sugieren que se exploren las posibilidades para continuar los estudios de inoculación con otras familias o grupos de plantas halófitas que puedan tener fines comerciales. Las consideraciones anteriores son importantes, porque el éxito de este tipo de poblaciones halotolerantes

Cuadro 1. Peso fresco y peso seco de planta de ecotipos de *Salicornia bigelovii* (SRCH = Santa Rosa Chica, SRG = Santa Rosa Grande, SC = Santa Cruz y CP = Cerro Prieto), inoculados con las bacterias Kp = *Klebsiella pneumoniae* y Ah = *Azospirillum halopraeferens*. Las letras indican diferencias significativas, Dunca con $P \leq 0.05$.

Ecotipo	0 M de NaCl		0.25 M de NaCl		0.5 M de NaCl	
	Peso fresco	Peso seco	Peso fresco	Peso seco	Peso fresco	Peso seco
	----- mg planta ⁻¹ -----					
SRCH-T	0.024 a	0.006 a	0.029 c	0.002 a	0.025 b	0.003 a
SRG-T	0.005 c	0.003 b	0.029 c	0.003 a	0.004 d	0.002 b
SC-T	0.013 b	0.003 b	0.012 d	0.001 b	0.013 c	0.003 a
CP-T	0.031 a	0.003 b	0.047 ab	0.004 a	0.014 c	0.005 a
SRCH-KI	0.027 a	0.003 b	0.038 ab	0.005 a	0.021 b	0.004 a
SRG-KI	0.010 b	0.002 b	0.029 c	0.003 a	0.024 b	0.004 a
SC-KI	0.026 a	0.002 b	0.021 c	0.002 a	0.002 d	0.001 b
CP-KI	0.020 a	0.002 b	0.063 a	0.005 a	0.025 b	0.004 a
SRCH-Az	0.022 a	0.003 b	0.028 c	0.004 a	0.038 a	0.005 a
SRG-Az	0.011 b	0.003 b	0.010 d	0.002 a	0.023 b	0.003 a
SC-Az	0.005 c	0.001 c	0.012 d	0.002 a	0.012 c	0.002 b
CP-Az	0.024 a	0.002 b	0.056 a	0.006 a	0.039 a	0.006 a

T = testigo; KI = *Klebsiella*; Az = *Azospirillum*.

usualmente sólo tienen una oportunidad en su historia de vida anual para reproducirse y dispersarse, eventos que son dependientes de las respuestas mostradas durante la germinación de semillas (Ungar, 2000). Tal es el caso de la germinación de *S. bigelovii*, que ocurre durante un período cuando en el suelo, los niveles de salinidad se encuentran reducidos (Riehl y Ungar 1982; Rozema 1975). De igual modo, los resultados obtenidos indican que los efectos benéficos de los microorganismos pueden tener un papel principal en las diferentes fases vegetativas, como es el proceso de la germinación (Kim y Weber 1985; Goodfriend *et al.*, 2000). Sin embargo, cabe indicar que los efectos observados de manera positiva deben evaluarse en el entorno de la aplicación práctica, como en el caso del desarrollo o propuesta de un programa agrícola costero (Hamdi, 1999; Neori y Zskova-KonZcalova, 2001).

Bacterias Adheridas de *Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens* al Sistema Radicular de Plántulas de Ecotipos de *Salicornia bigelovii*

Acorde a una salinidad de 0 M de NaCl, el número de bacterias adheridas a la raíz, la bacteria Kp mostró una mayor afinidad con el ecotipo SRG con un promedio de 1410 UFC mL⁻¹. Considerando una molaridad de 0.25 M de NaCl, el valor máximo de UFC adheridas fue para el ecotipo CP con 1710, mientras que en un segundo plano SRG resultó tener 1500 UFC mL⁻¹. A una salinidad de 0.5 M NaCl, se observó con Kp en SRG (1560 UFC mL⁻¹) y Ah con CP (1420). Como se puede observar las Unidades Formadoras de Colonias de Ah y Kp, se comportaron uniformemente considerando las tres salinidades. Los anteriores resultados coinciden con investigaciones (Arsac *et al.*, 1990; Haahtela *et al.*, 1990; El-Khawas y Adachi, 1999) donde indican que metabolitos secretados por los pelos radiculares juegan un papel importante para la atracción-adhesión y anclaje.

CONCLUSIONES

-Los resultados obtenidos en la presente investigación, sugieren la factibilidad de usar bacterias promotoras del crecimiento de plantas como *Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum halopraeferens* en las etapas de vegetación de germinación y plántula de *Salicornia bigelovii*.

-Queda demostrado que los ecotipos utilizados en esta investigación con el uso de las bacterias estudiadas,

la germinación es superior cuando se hace uso de bajas concentraciones de salinidad; lo cual es indicativo de que en forma natural *Salicornia bigelovii* germina en las épocas de lluvia, pues es cuando existe una reducción de concentración de sal en el mar.

-No obstante lo anterior, cuando de forma natural, la germinación de salicornia es inhibida por la salinidad, se observó que entre los ecotipos estudiados (Santa Rosa Chica, Santa Rosa Grande, Santa Cruz y Cerro Prieto) existieron diferencias significativas, obteniendo como resultado que Cerro Prieto mostró tolerancia significativa en la variable de germinación y producción de plántula a 0.25 M de cloruro de sodio (NaCl).

-El ecotipo Cerro Prieto presenta expectativas de ser estudiada en las restantes etapas fenológicas de floración y madurez fisiológica, con la interacción de bacterias promotoras de crecimiento de plantas con la finalidad de reafirmar sus usos como posibles y potenciales biofertilizantes en cultivos halotolerantes para la agricultura.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Sectorial de Investigación en Materia Agrícola, Pecuaria, Acuicultura, Agro-biotecnología y Recursos Filogenéticos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a la Comisión Nacional Forestal y la Universidad de Sonora, a través del proyecto clave 14651; y estancia aprobada del Dr. Bernardo Murillo Amador en Apoyos Complementarios para la Consolidación Institucional de Grupos de Investigación (Repatriación, Retención y Estancias de Consolidación)-2007.

LITERATURA CITADA

- Arsac, J. F., C. Lamothe, D. Mulard, and J. Fages. 1990. Growth enhancement of Maize (*Zea Mays*) through *Azospirillum lipoferum* inoculation: effect of plant genotype and bacterial concentration. *Agronomie* 10: 640-654.
- Allison, L. E., J. W. Brown., H. E. Hayward, L.A. Richards, L. Bernstein, M. Fireman, G. A. Pearson, L. V. Wilcox, C. A. Bower, J. T. Hatcher y R. C. Reeve. 1980. Suelos salinos sódicos. Ed. Limusa. México.
- Bashan, Y. and G. Holguin. 1997. *Azospirillum*-plant relationship: environmental and physiological advances. *Can. J. Microbiol.* 43: 103-121.
- Bashan, Y., M. Moreno and E. Troyo. 2000. Growth promotion of the seawater-irrigated oilseed halophyte *Salicornia bigelovii* inoculated with mangrove rhizosphere bacteria and halotolerant *Azospirillum* spp. *Biol. Fertil. Soils* 32: 265-272.

- Besnier, F. 1989. Semillas biología y tecnología. Ediciones Mundi-Prensa. Castelló, Madrid, España.
- Camacho, F. 1994. Dormancia de semillas: causas y tratamientos. Ed. Trillas. México.
- Carrillo, A., M. Puente, T. Castellanos y Y. Bashan. 1998. Aplicaciones biotecnológicas de ecología microbiana. Manual de laboratorio. Eds. Pontificia Universidad Javeriana, Santa Fe de Bogotá, Colombia y Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste S. C. La Paz, Baja California Sur, México.
- Díaz Vargas, P., R. Ferrera-Cerrato, J. J. Almaraz Suárez y G. Alcántar González. 2001. Inoculación de bacterias promotoras del crecimiento en lechuga. *Terra* 19: 327-335.
- El-khawas, H. and K. Adachi. 1999. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effects on rice roots. *Biol. Fertil. Soils* 28: 377-381.
- Fallik, E., S. Saring. and Y. Okon. 2000. *Azospirillum/Plant Associations*. Edited by Y. Okon. CRC Press. Boca Raton, FL, USA.
- Goodfriend, W. L., M. W. Olsen, and R. J. Frye. 2000. Soil microfloral and microfaunal response to *Salicornia bigelovii* planting density and soil residue amendment. *Plant Soil* 223: 23-32.
- Hahtela, K., R. Ronkko, T. Laakso, P. H. Williams, and T. K. Korhonen. 1990. Root-associated *Enterobacter* and *Klebsiella* in *Poa pratensis*: Characterization of an iron-scavenging system and a substance stimulating root hair production. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3: 358-365.
- Hamdi, H. 1999. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 968-989.
- Kim, C. K. and D. J. Weber. 1985. Distribution of VA mycorrhiza on halophytes on inland salt playas. *Plant Soil* 83: 207-214.
- Lira S., R. H. 2003. Fisiología vegetal. Ed. Trillas. México., D. F.
- Maguire, J. H. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci.* 2: 176-177.
- Martínez, B. 1996. Producción agraria ecológica. *Revista de Desarrollo Rural y Cooperativismo Agrario*. Universidad de Zaragoza. Vol. 5. <http://cederul.unizar.es/revista/inicio.htm>.
- Mota, U. 1980. Las halófitas en el siglo XXI. p. 495-500. *In*: Primera reunión nacional sobre ecología, manejo y domesticación de las plantas útiles del desierto. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. Monterrey, México.
- Mota, U. 1990. Seawater irrigation crops *Salicornia* (SOS7) as an example. University of Arizona. Tucson, AZ., USA.
- Mota, U. 1996. Levels of fertilizer in *Salicornia bigelovii*. *In*: First international technical seminar for *Salicornia*. Proceedings. Planetary Design Corporation. Puerto Peñasco, Sonora, México.
- Mota, U. 1999. Sistemas de riego aplicados a la producción de alimentos con agua de mar. Primer simposium internacional sobre financiamiento para modernización de áreas de riego. Hermosillo, Sonora, México.
- Murillo-Amador, B., E. Troyo-Diéguez, H. G. Jones, F. Ayala-Chairez, C. L. Tinoco-Ojanguren, and A. López-Cortés. 2000. Screening and classification of cowpea genotypes for salt tolerance during germination. *J. Exp. Bot.* 67: 71-84.
- Neori, A., R. K. Ramesh, H. Ciscova-Konkalova, and M. Agami. 2000. Bioactive chemicals and biological-biochemical activities and their functions in rhizospheres of wetland plants. *Bot. Rev.* 66: 350-378.
- Puente, M., G. Holguin, B. Glick, and Y. Bashan. 1999. Root-surface colonization of black mangrove seedlings by *Azospirillum halopraeferens* and *Azospirillum brasilense* in seawater. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29: 283-292.
- Reinhold, B., T. Hurek, I. Fendrik, B. Pot, M. Gillis, K. Kersters, S. Thielmans, and J. De Ley. 1987. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov. a nitrogen-fixing organism associated with roots of *Kallar grass* (*Leptochloa fusca* L. Kunth). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:43-51.
- Rennie, R. J. 1981. A single medium for the isolation of acetylene reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Can. J. Microbiol.* 27: 8-14.
- Rueda Puente, E. O., T. Castellanos, E. Troyo Diéguez, and J. L. Díaz de León-Alvarez. 2004. Effect of *Klebsiella pneumoniae* and *Azospirillum halopraeferens* on the growth and development of two *Salicornia bigelovii* genotypes. *Australian J. Exp. Agric.* 44: 65-74.
- Rueda Puente, E., T. Castellanos, E. Troyo Diéguez, J. L. Díaz de León-Alvarez, and B. Murillo Amador. 2003. Effects of 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: 323-332.
- Rozema, J. 1975. The influence of salinity, inundation and temperature on the germination of some halophytes and non-halophytes. *Oecol. Plant.* 10: 341-353.
- SAS Institute. 2001. SAS user's guide: statistics. Version 6.12 SAS, Institute, Cary, NC, USA.
- Snedecor, G. 1956. Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology. The Iowa State College Press. Ames, IA, USA.
- Sokal, R. and J. Rohlf. 1988. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. Freeman & Co. San Francisco, CA, USA.
- Ungar, I. 2000. Ecophysiology of vascular halophytes. Department of Botany. Ohio University. Athens, Ohio, USA.