



**UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA**
Unidad Xochimilco



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA LA LIBERACIÓN DEL SERVICIO SOCIAL:

“Evaluación del efecto promotor del crecimiento de *Bacillus cabrialesii* P35 sobre plántulas y semillas de *Echinocactus platyacanthus* (biznaga dulce)”

Alumna: Elsy Paulina Cisneros Azuceno

Matricula: 2163025627

Asesores:

DR. HUGO CÉSAR RAMÍREZ SAAD
(Asesor interno)

DRA. MARÍA EUGENIA DE LA TORRE HERNÁNDEZ
(Asesora externa)

Lugar de realización: LABORATORIO DE ECOLOGÍA MOLECULAR, EDIFICIO N, UAM-X. CALZADA DEL HUESO 1100, COLONIA VILLA QUIETUD, ALCALDÍA COYOACÁN, CIUDAD DE MÉXICO.

Fecha de inicio: 15 de marzo de 2023

Fecha de terminación: 15 de septiembre 2023

Contenido

INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEÓRICO	3
Zonas áridas y semiáridas (ZAS) de México.	3
Familia <i>Cactaceae</i>	4
<i>Echinocactus platyacanthus</i> (biznaga dulce).....	4
Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)	4
Género <i>Bacillus</i> como bacteria promotora del crecimiento (PGPR).....	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	5
OBJETIVOS	5
General.....	5
Objetivos Específicos	6
ANTECEDENTES.....	6
MATERIALES Y MÉTODO.....	6
1. ENSAYO DE INOCULACIÓN: Evaluación de la capacidad de <i>B. cabrialesii</i> P35 como PGPR en plántulas de <i>E. platyacanthus</i>	6
1.1. Inoculación y reinoculación de las raíces de plántulas.....	7
1.2. Cultivo de las plántulas de <i>E. platyacanthus</i>	7
1.3. Análisis estadístico.....	7
2. ENSAYO DE GERMINACIÓN: Evaluación del efecto de <i>Bacillus cabrialesii</i> P35 en la germinación de semillas de <i>E. platyacanthus</i>	8
2.1. Inoculación de semillas de <i>E. platyacanthus</i>	8
2.2. Cultivo de semillas de <i>E. platyacanthus</i> inoculadas.....	8
2.3. Análisis estadístico.....	8
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
1. Evaluación de la capacidad PGPR de <i>B. cabrialesii</i> P35 en plántulas de <i>E. platyacanthus</i>	9
2. Evaluación de la capacidad PGPR de <i>B. cabrialesii</i> P35 en semillas de <i>E. platyacanthus</i>	12
CONCLUSIONES	16
ANEXOS.....	19
Anexo A. Preparación de la suspensión bacteriana de <i>Bacillus cabrialesii</i> P35.....	19
Anexo B. Preparación de medios y soluciones.	20
Anexo C. Lavado y desinfección de semillas de <i>E. platyacanthus</i>	21

INTRODUCCIÓN

Las zonas áridas y semiáridas (ZAS) tienen condiciones ambientales extremas que son estresantes para la reproducción y desarrollo de especies vegetales, sin embargo, poseen una riqueza de plantas endémicas destacando la familia *Cactaceae* que, gracias a su metabolismo y la anatomía de sus tejidos ha podido adaptarse a las condiciones hostiles propias de estas regiones, como lo son el exceso de radiación UV, las temperaturas extremas, además de la escasez de agua y de nutrientes (Flores, 2016). Debido a su explotación por actividades antropogénicas, gran parte de las plantas de esta familia están clasificadas, según la NOM-059-SEMARNAT-2010, en alguna de las siguientes categorías: especie amenazada, en peligro de extinción o sujeta a protección especial. Actualmente en México *Echinocactus platyacanthus* se encuentra sujeta a protección especial debido a que es utilizada para fabricar el dulce tradicional conocido como acitrón, situación que ha provocado la colecta ilegal de forma masiva, conduciendo a la reducción de sus poblaciones. Dada esta situación, es necesario proponer técnicas que permitan ayudar a su conservación. Se ha intentado la propagación de *E. platyacanthus* en viveros con fines de reforestación de su hábitat, sin embargo, la tasa de supervivencia es muy baja debido al cambio drástico de condiciones ambientales. La utilización de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) como biofertilizante para mejorar la germinación, el crecimiento de las plantas y la resistencia a fitopatógenos podría incrementar la tasa de supervivencia de las plántulas que son introducidas en las ZAS.

En el laboratorio de Ecología Molecular de la UAM Xochimilco se aisló e identificó una colección de 268 bacterias presentes en la rizosfera de *E. platyacanthus* silvestres que se agruparon en 45 ribotipos, de los cuales, 12 pertenecían al género *Bacillus*. Se probaron las actividades PGPR de estas cepas encontrando que los aislados pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* desempeñaron más actividades de este tipo en ensayos *in vitro* e *in planta*, utilizando a *Arabidopsis thaliana* como modelo de rápido crecimiento. *Bacillus cabrialesii* P35 fue una de las 4 cepas que desarrollaron actividades PGPR como solubilización de fosfato (28 µg/mL), producción de ácido indol acético (57.92 µg/mL), además de inhibir en 49.17% el crecimiento de *Fusarium solani* (Salinas-Virgen, 2019). No obstante, a pesar de que esta cepa ha mostrado un buen desempeño en los experimentos mencionados, es necesario probar el efecto de *B. cabrialesii* P35 directamente en *E. platyacanthus*, de donde se aisló inicialmente, para comprobar si ejerce un efecto promotor del crecimiento sobre esta cactácea.

En el presente trabajo, realizado en el laboratorio de Ecología Molecular de la UAM Xochimilco, se analizó la capacidad PGPR de *Bacillus cabrialesii* P35 en el desarrollo de plántulas y en la germinación de semillas de *E. platyacanthus*, evaluando como parámetros de germinación el porcentaje, el tiempo y la velocidad de ésta, así como el porcentaje de sobrevivencia, después del trasplante de las semillas germinadas. Para evaluar del crecimiento vegetal se tomaron como parámetros la altura, el diámetro del cuerpo aéreo, la longitud de raíces y el peso húmedo (total, de las raíces y del cuerpo aéreo por separado) de las plántulas.

MARCO TEÓRICO

Zonas áridas y semiáridas (ZAS) de México.

Son aquellas en las que la precipitación pluvial media al año es de hasta 600 mm. Su distribución abarca casi el 65% del territorio mexicano (CONAZA, 2021). Aunque estas zonas presentan condiciones ambientales limitantes

para la reproducción y el desarrollo de especies vegetales (Flores, 2016), poseen una gran riqueza de plantas endémicas, destacando los miembros de la familia *Cactaceae* que han desarrollado evolutivamente la capacidad de almacenar gran cantidad de agua y han podido adaptarse a la sequía que predomina en estas zonas (Alanís & Velazco, 2008). Considerando que, en 2012, cerca del 70% de las ZAS del territorio nacional eran susceptibles de desertificación, la cual es definida por Granados-Sánchez *et. al.* (2012) como “*la degradación de las tierras de zonas áridas, semiáridas y subhúmedas secas, que resulta de factores de origen climático y de actividades antropogénicas como la deforestación, el sobrepastoreo, la expansión de áreas agrícolas hacia áreas frágiles y la sobreexplotación de la vegetación para uso doméstico*”, los miembros de la familia *Cactaceae* resultan de gran importancia en estas zonas debido a que ayudan a la estabilización del suelo por medio del desarrollo de raíces que permiten la acumulación y formación de nuevas capas del suelo (Bashan, *et. al.*, 2005), retrasando el proceso de desertificación.

Familia *Cactaceae*

Las cactáceas son plantas nativas y endémicas del continente americano que se distribuyen en las zonas áridas y semiáridas (Bravo-Hollis, 1978 y Alanís & Velazco, 2008). México es el país más importante en cuanto al número de cactáceas endémicas, se estima la existencia de 669 especies pertenecientes a 63 géneros. Las acciones antropocéntricas como el cambio de uso de suelo, la introducción de especies exóticas y la colecta directa (Jiménez, 2011), han propiciado que algunas especies se encuentren en alguna de las siguientes categorías: especie amenazada, en peligro de extinción o sujeta a protección especial, según la NOM-059-SEMARNAT-2010, tal es el caso de *Echinocactus platyacanthus*, una cactácea sujeta a protección especial.

***Echinocactus platyacanthus* (biznaga dulce)**

Es una cactácea endémica de México (Jiménez, 2011) también conocida como biznaga dulce; alcanza los 2 metros de altura y hasta 1.2 metros de diámetro (Castañeda-Romero *et. al.* 2016). Es una especie cuyo aprovechamiento debería limitarse por tener poblaciones reducidas (Gómez-Serrano *et. al.*, 2021) debido a la extracción directa de ejemplares para su uso en la fabricación del dulce tradicional conocido como acitrón (Castañeda-Romero *et. al.*, 2016). Además de este tipo de protección, se podrían utilizar técnicas que permitan aumentar el desarrollo y supervivencia de las plántulas cuando son trasplantadas a su hábitat, como es el caso del uso de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR, por sus siglas en inglés).

Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)

Son bacterias de vida libre que habitan en el suelo, facilitando el enraizamiento y crecimiento de las plantas; normalmente están presentes en la zona rizosférica, donde establecen una relación mutualista con la planta (Kashyap *et. al.*, 2019). Los mecanismos bacterianos de promoción del crecimiento vegetal (PGPR) pueden clasificarse como directos e indirectos, pudiendo actuar de manera simultánea en distintas etapas del crecimiento de la planta. Los mecanismos directos permiten el suministro de nutrientes esenciales como nitrógeno, fósforo, potasio y minerales en general, mediante la solubilización de sus formas no disponibles o a través de la producción de sideróforos y amoníaco. Los mecanismos indirectos son aquellos que ejercen efectos inhibitorios sobre otros microorganismos, normalmente a través de la producción de sustancias antagonicas o induciendo la resistencia de la planta hacia microorganismos patógenos (Sansinenea, 2019). Existen varios géneros que han sido reportados

como PGPR, entre ellos podemos mencionar *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Salinas-Virgen, 2019; Sansinenea, 2019; Kashyap *et. al.*, 2019). De ellos, *Bacillus* es uno de los géneros mejor caracterizados en cuanto a las capacidades PGPR que posee.

Género *Bacillus* como bacteria promotora del crecimiento (PGPR)

Se trata de bacilos Gram + capaces de formar esporas, lo cual les permite sobrevivir en diferentes hábitats (Corrales *et. al.*, 2017). Aprovechan los exudados de las raíces de las plantas para adquirir la fuente de carbono necesaria para su crecimiento. El proceso de asociación se lleva a cabo por quimiotaxis, en donde las moléculas vegetales secretadas actúan como señalizadores que atraen a las bacterias (Kashyap *et. al.*, 2019). *Bacillus* sp. es considerado como PGPR debido a que secreta proteínas y metabolitos que ayudan en el control de plagas y enfermedades (Sansinenea, 2019), promueve el crecimiento vegetal a través de la producción de sustancias que facilitan la solubilización de fosfatos (Salinas-Virgen, 2019; Corrales *et. al.*, 2017), y produce reguladores del crecimiento como el ácido indol acético (Salinas-Virgen, 2019).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

México es el país con mayor riqueza de cactáceas, sin embargo, acciones como el cambio de uso del suelo, la introducción de especies exóticas y la excesiva colecta directa (Jiménez, 2011), han propiciado que varias especies estén bajo alguna categoría de amenaza a su supervivencia (SEMARNAT, 2010). *Echinocactus platyacanthus* popularmente conocida como biznaga dulce, biznaga burra o biznaga barril (Castañeda-Romero *et. al.*, 2016) es una de las especies más afectadas debido a la colecta excesiva sumado a su lento desarrollo y crecimiento. Esto representa un problema grave ya que la pérdida de especies genera un empobrecimiento de las comunidades bióticas de las zonas áridas y semiáridas donde se desarrollan estos ejemplares (Jiménez, 2011).

La alteración de la vegetación, sobre todo en las ZAS, genera la pérdida de la cubierta vegetal original de los suelos, lo cual es uno de los procesos primarios causantes de la desertificación (Granados-Sánchez *et. al.*, 2012). Es de vital importancia tomar medidas que permitan asegurar la supervivencia de especies vegetales como las cactáceas, características de estas zonas, que suelen tener tasas de crecimiento bajas y altas tasas de mortalidad al intentar introducirlas a su hábitat natural después de haber sido cultivadas en invernadero, presumiblemente por la ausencia de bacterias que coadyuvan en el establecimiento de las plántulas en los suelos empobrecidos, propios de las regiones antes mencionadas.

Es por esto que, en el presente trabajo, se evaluó *in planta* el efecto promotor del crecimiento vegetal que tiene *Bacillus cabrialesii* P35 directamente sobre plántulas y semillas de *Echinocactus platyacanthus*.

OBJETIVOS

General

Analizar la capacidad PGPR de *Bacillus cabrialesii* P35 en la germinación de semillas y el desarrollo de plántulas de *Echinocactus platyacanthus* (biznaga dulce).

Objetivos Específicos

1. Evaluar la capacidad de *Bacillus cabrialesii* P35 como PGPR en plántulas de *Echinocactus platyacanthus* cuyas raíces sean inoculadas con una suspensión bacteriana.
2. Evaluar el efecto de *Bacillus cabrialesii* P35 en la germinación de semillas de *Echinocactus platyacanthus* inoculadas con una suspensión bacteriana.

ANTECEDENTES

En 2015, en el laboratorio de Ecología Molecular de la UAM-X se realizó un muestreo de la rizosfera de *E. platyacanthus* silvestres en Tolimán, Querétaro. A partir de la caracterización de las bacterias cultivables presentes en esas muestras se aislaron 36 cepas, principalmente de los géneros *Bacillus* (21 cepas) y *Pseudomonas* (7 cepas; Salinas-Virgen, 2015); de ellas, se identificaron 4 del género *Bacillus* capaces de realizar actividades PGPR *in vitro* (solubilización de fosfato, producción de ácido indolacético y biocontrol de hongos fitopatógenos), además de evaluar su efecto promotor del crecimiento sobre el modelo vegetal *Arabidopsis thaliana*. La cepa que mostró un mejor desempeño fue P35, identificada filogenéticamente como *Bacillus cabrialesii* (Salinas-Virgen, 2019). Estos trabajos previos dieron pie a la realización de la presente investigación.

MATERIALES Y MÉTODO

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Ecología Molecular de la UAM-X (Edificio N, 1er piso, laboratorio 105). Previo a la inoculación de las plántulas y las semillas, se preparó una suspensión bacteriana a partir de un cultivo puro de *B. cabrialesii* P35 (Anexo A).

Material biológico

En el **ensayo de germinación** se utilizaron 40 semillas de *E. platyacanthus* para cada tratamiento (control e inoculación con *B. cabrialesii* P35). Para el **ensayo de inoculación** se utilizaron 86 plántulas de *E. platyacanthus* de 6 meses de edad cultivadas para este proyecto en la Universidad Autónoma de Querétaro, campus Juriquilla; de ellas, 30 provenían de semillas inoculadas con una suspensión de *B. cabrialesii* P35 que se utilizaron para el ensayo de reinoculación y 56 provenían de semillas sin inocular, tomándose de estas últimas 30 plántulas para el control y 26 plántulas para el ensayo de inoculación.

1. ENSAYO DE INOCULACIÓN: Evaluación de la capacidad de *B. cabrialesii* P35 como PGPR en plántulas de *E. platyacanthus*

Diseño experimental.

Se establecieron 2 tratamientos: un tratamiento control con solo solución salina al 0.9% y un tratamiento que consistió en una suspensión de *B. cabrialesii* P35 con una densidad óptica de 0.6 a 600 nm. Estos tratamientos se aplicaron a 3 grupos de plántulas de la siguiente manera:

- 30 plántulas provenientes de semillas sin inocular se les aplicó el tratamiento control
- 26 plántulas provenientes de semillas sin inocular se les aplicó el tratamiento de *B. cabrialesii* P35
- 30 plántulas provenientes de semillas inoculadas con suspensión de *B. cabrialesii* P35 se les aplicó el tratamiento de *B. cabrialesii* P35 (reinoculación)

1.1. Inoculación y reinoculación de las raíces de plántulas

- 1.1.1. Se retiró el exceso de sustrato para cactáceas (tezontle, tepojal, agrolita, fibra de coco y tierra) de las raíces de 26 plántulas sin inocular y 30 plántulas previamente inoculadas con *B. cabrialesii* P35, cuidando de no romperlas.
- 1.1.2. Las raíces fueron sumergidas durante dos horas en 10 mL de la suspensión bacteriana ajustada (Anexo A), a temperatura ambiente, bajo condiciones asépticas.
- 1.1.3. Pasando este tiempo, las plántulas fueron sembradas en macetas con sustrato para cactáceas previamente hidratado con agua.
- 1.1.4. Después de plantarlas, se asperjó la base de cada plántula con aproximadamente 2 mL de la suspensión bacteriana ajustada.
- 1.1.5. Se realizó el mismo procedimiento para el control negativo, utilizando solución salina (NaCl 0.9%) estéril en lugar de la suspensión bacteriana.

1.2. Cultivo de las plántulas de *E. platyacanthus*

- 1.2.1. Las macetas con las plántulas control, inoculadas y reinoculadas se colocaron en el invernadero del edificio W de la UAM-Xochimilco, a temperatura ambiente ($24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) y humedad relativa de 33%.
- 1.2.2. Todas las plántulas fueron regadas con 5 mL de agua cada tercer día.
- 1.2.3. Después de 90 días de cultivo, se evaluaron como parámetros de crecimiento la altura y el diámetro de todas las plántulas.
- 1.2.4. También se evaluaron otros parámetros de crecimiento como; longitud y peso de las raíces, peso total y del cuerpo aéreo, en las plántulas de todos los tratamientos.

1.3. Análisis estadístico

- 1.3.1. Con las mediciones realizadas se creó una base de datos en Excel y se analizaron con el programa estadístico R utilizando una prueba T de Student con un nivel de significancia del 95% para el análisis de cada variable.

2. ENSAYO DE GERMINACIÓN: Evaluación del efecto de *Bacillus cabrialesii* P35 en la germinación de semillas de *E. platyacanthus*

Diseño experimental.

Se establecieron 2 tratamientos: un tratamiento control con solo solución salina al 0.9% y un tratamiento que consistió en una suspensión de *B. cabrialesii* P35 con una densidad óptica de 0.6 a 600 nm. El tratamiento control se aplicó a 40 semillas y el tratamiento de *B. cabrialesii* P35 a otras 40 semillas.

2.1. Inoculación de semillas de *E. platyacanthus*

- 2.1.1. Se prepararon cajas con medio sólido agar-agua (Anexo B).
- 2.1.2. Se lavaron y desinfectaron 80 semillas (Anexo C)
- 2.1.3. Se sembraron las semillas, control e inoculadas, en placas agar-agua (1.2%) y se incubaron a temperatura ambiente con un fotoperiodo de 14 horas luz por 10 de oscuridad.

2.2. Cultivo de semillas de *E. platyacanthus* inoculadas.

- 2.2.1. Se monitoreó el avance de la germinación de las semillas inoculadas con *B. cabrialesii* P35 y las del tratamiento control; una vez protruida la radícula, se consideró iniciada la germinación. Se evaluó diariamente la cantidad de semillas germinadas y el tiempo en que germinaron, así se pudieron calcular el porcentaje y la velocidad de germinación.
- 2.2.2. Transcurridos 28 días de cultivo, las plántulas se trasplantaron a sustrato para cactáceas (tezontle, tepojal, agrolita, fibra de coco y tierra negra) en macetas individuales.
- 2.2.3. Se asperjaron con agua estéril cada semana y se cultivaron durante 63 días más.
- 2.2.4. Transcurrido este periodo, se tomaron los datos de supervivencia de todas las plántulas (control y tratadas con *B. cabrialesii* P35).

2.3. Análisis estadístico

- 2.3.1. Con las mediciones realizadas se creó una base de datos en Excel y se analizaron con el programa estadístico R utilizando una prueba ji cuadrada con un nivel de significancia del 95% para el análisis de los porcentajes de germinación y de supervivencia

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La inoculación de las plántulas de *E. platyacanthus* se realizó con un cultivo puro de *Bacillus cabrialesii* P35, del cual se realizó una tinción Gram. En el reporte original de *B. cabrialesii* (de los Santos Villalobos, et al. 2019), los describen con morfología de bastón, Gram positivos, además de que su morfología colonial es circular y plana, con una coloración blanca. Estas características son similares a las observadas en nuestra cepa *B. cabrialesii* P35 (Figura 1), y a la reportada por Salinas-Virgen (2015).

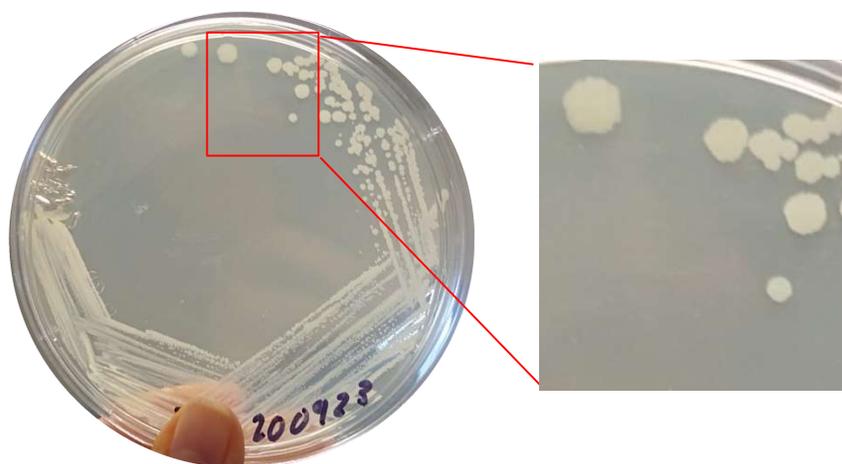


Figura 1. Morfología colonial de *Bacillus cabrialesii* P35. Cultivo en medio sólido TY para heterótrofos totales. Se observan colonias con coloración amarillo claro, de forma circular, opacas, planas y con bordes lobulados; morfología previamente descrita para *Bacillus cabrialesii* P35 por Salinas-Virgen (2015).

1. Evaluación de la capacidad PGPR de *B. cabrialesii* P35 en plántulas de *E. platyacanthus*

Tomando en cuenta que se tienen bien identificadas las capacidades PGPR del género *Bacillus*, dentro de las cuales podemos mencionar la capacidad para solubilizar fosfato, producir reguladores del crecimiento y ejercer control biológico sobre algunos patógenos vegetales (Bashan et al., 2013; Sivasakthi et al., 2014; Corrales, et. al., 2017; Sansinenea, 2019; Kashyap et al., 2019; Salinas-Virgen, 2019), se esperaba obtener resultados favorables en el uso de *B. cabrialesii* P35 sobre las plántulas de *E. platyacanthus*, como se observó previamente en *A. thaliana* (Salinas-Virgen, 2019)

B. cabrialesii es una especie recientemente descrita. La cepa TE3^T fue aislada por Valenzuela-Aragón et. al. en 2018 como bacteria endófito de trigo en el Valle del Yaqui, México, sin embargo, fue hasta 2019 que se identificó como nueva especie por De los Santos Villalobos et. al., quienes le asignaron el nombre de *Bacillus cabrialesii* en honor al microbiólogo mexicano Juan José Peña Cabriales; en ese mismo año se empezó a caracterizar y se reportó su actividad PGPR, así como agente de control biológico (Villa-Rodríguez et. al., 2019). Esta cepa fue capaz de solubilizar fosfatos ($43.2 \pm 1.7\%$), producir indoles ($1.4 \pm 0.1\%$), reducir nitratos y ejercer control biológico sobre *Bipolaris sorokiniana*. Un año después, Rojas-Padilla, et. al. (2020) encontraron resultados similares con la misma cepa en cuanto a la producción de indoles ($8.21 \pm 1.35 \mu\text{g/mL}$) y la solubilización de fósforo (índice = 1.43 ± 0.04).

Por su parte, la cepa *B. cabrialesii* P35, utilizada en el presente trabajo, fue aislada de la rizosfera de *E. platyacanthus* silvestres del semidesierto de Querétaro (Salinas-Virgen, 2015) y es capaz de solubilizar $28 \mu\text{g/mL}$ de fosfato, producir $57.92 \mu\text{g/mL}$ de ácido indol acético y ejercer control biológico sobre *Fusarium solani* con un porcentaje de inhibición de 49.17 ± 1.44 (Salinas-Virgen, 2019).

De acuerdo con las capacidades PGPR reportadas para esta especie bacteriana, los resultados obtenidos respecto al crecimiento de las plántulas de *E. platyacanthus* son los esperados debido a que las plántulas inoculadas con la

suspensión de *B. cabrialesii* P35 mostraron un aumento significativo en altura (24%, $p=0.01307$), diámetro (25%, $p=0.00691$), peso de la raíz (86%, $p=0.04322$), peso del cuerpo aéreo (94%, $p=0.00723$) y peso total de la plántula (92%, $p=0.00930$), respecto al tratamiento control (Figura 2), por lo que podemos inferir que la suspensión de *B. cabrialesii* P35 tuvo un efecto promotor del crecimiento sobre las plántulas de *E. platyacanthus* en las que se probó.

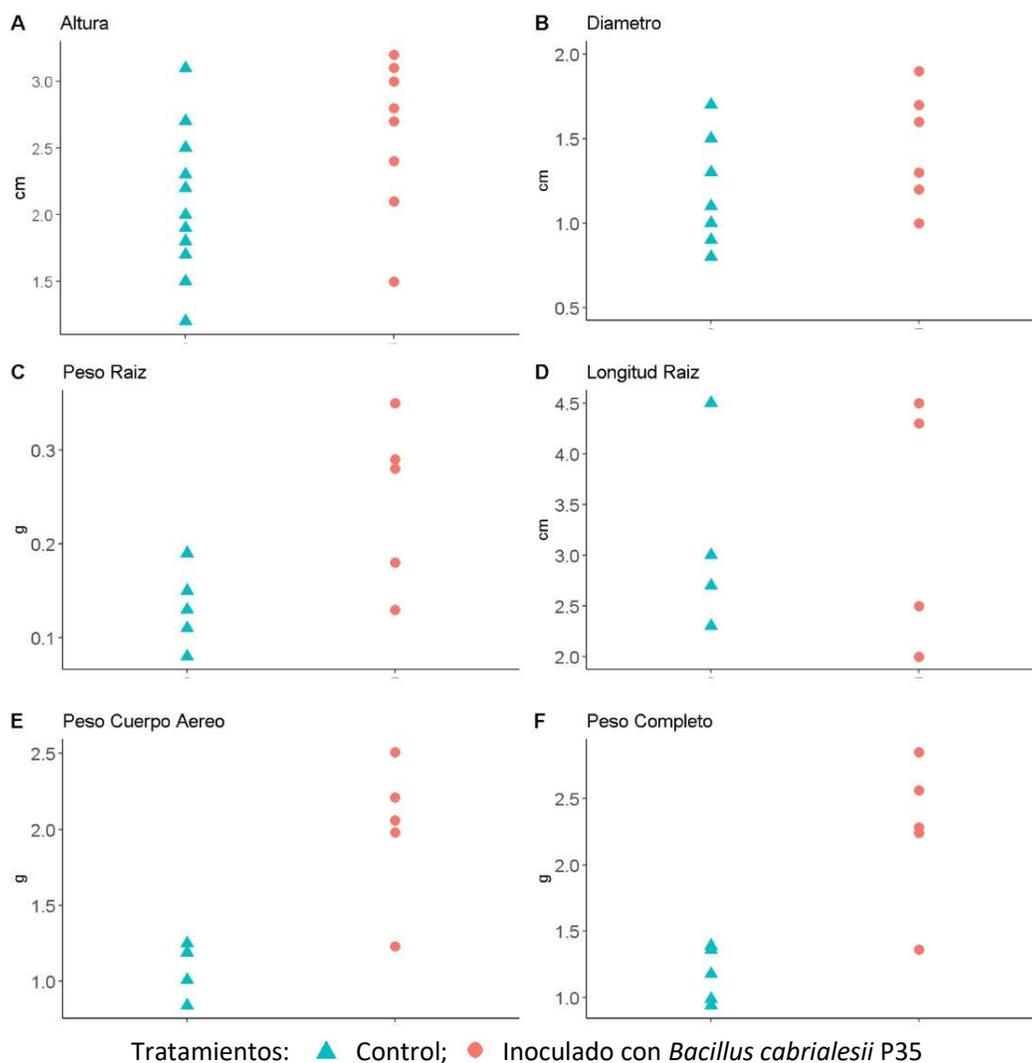


Figura 2. Efecto de la inoculación con *B. cabrialesii* P35 en el crecimiento de plántulas de *Echinocactus platyacanthus*. Las evaluaciones se realizaron a los 90 días. A) Altura de las plántulas*; B) Diámetro de las plántulas*; C) Peso de las raíces*; D) Longitud de las raíces; E) Peso del cuerpo aéreo*; F) Peso de las plántulas completas*. En los parámetros marcados con * se encontraron diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de T de Student ($p < 0.05$).

Salinas-Virgen (2019) reportó que *B. cabrialesii* P35 tuvo un efecto promotor del crecimiento en *Arabidopsis thaliana* ya que disminuyó a 2.42 semanas el tiempo de aparición del tallo principal, a 4.25 semanas el tiempo de

aparición de los tallos secundarios y a 2.58 semanas la aparición de las inflorescencias, por otra parte, aumentó a 7.17 el número total de tallos, a 42.92 el número de inflorescencias y a 3.18 cm el diámetro de la roseta respecto al tratamiento control.

Robles-Montoya *et. al* (2020) reportaron que la cepa TE3^T de *B. cabrialesii*, utilizada en conjunto con otras especies del género *Bacillus* (*B. megaterium* TRQ8 y *B. paralicheniformis* TRQ65), podrían tener un efecto PGPR en plántulas de trigo al observar que esta mezcla bacteriana provocó un aumento en la longitud de la parte aérea (28%), longitud de la raíz (25%), longitud total (28%), diámetro del tallo (46%), circunferencia de la planta (50%), peso seco de la parte aérea (72%) e índice de biovolumen calculado como la altura de la planta por la altura del tallo (57%), respecto al control. Por otra parte, Rojas-Padilla *et. al.* (2022) encapsularon en alginato, de manera individual y en forma de mezcla, estas mismas cepas y las probaron en plántulas de trigo; observaron que *B. cabrialesii* TE3^T provocó un aumento significativo en el peso seco de la raíz (53.3 %), mientras que la coinoculación de las cepas (TRQ8+TRQ65+ TE3^T) condujo al aumento en las longitudes del tallo (11.7%) y de la raíz (7.9 %), en comparación con el tratamiento control (sin inoculación).

En el presente trabajo, aunque el análisis estadístico realizado indica que no existe un efecto significativo de la longitud de la raíz en el tratamiento con *B. cabrialesii* P35, de manera directa sí pudo observarse que la raíz primaria de las plántulas de *E. platyacanthus* que fueron inoculadas con la suspensión bacteriana era notoriamente más gruesa, además de que hubo un mayor desarrollo de raíces secundarias y pelos radiculares, aumentado así el peso de la raíz respecto a las plántulas control (Figura 3). Este resultado podría estar relacionado con la producción de ácido indolacético reportada previamente para *B. cabrialesii* P35 (57.92 µg/mL; Salinas-Virgen, 2019) puesto que se trata de una auxina que promueve el crecimiento vegetal mediante la estimulación del alargamiento de la raíz primaria, de las raíces secundarias y del desarrollo de pelos radiculares, dependiendo de la concentración en la que se encuentre (Sansinenea, 2019).

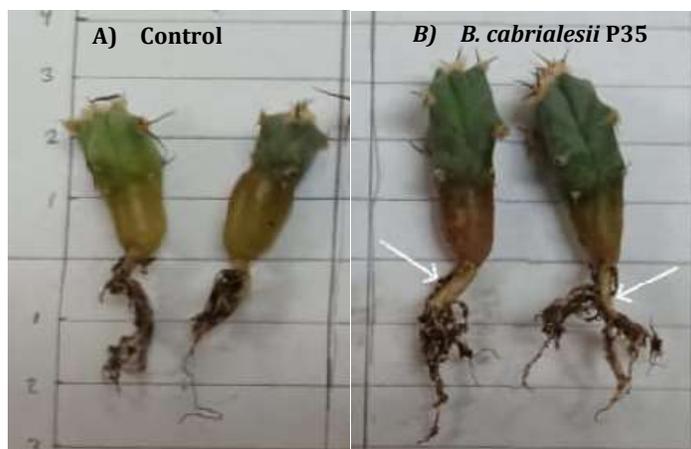


Figura 3. Efecto de *B. cabrialesii* P35 en plántulas de *E. platyacanthus*. A) Plántulas inoculadas con solución salina (control); B) Plántulas inoculadas con suspensión de *B. cabrialesii* P35. Puede observarse un aumento en la altura, aumento en el grosor de la raíz primaria (señalada con flechas), aumento en la cantidad de raíces secundarias y pelos radiculares en las plántulas inoculadas con *B. cabrialesii* P35 (B) respecto a las plántulas control (A).

Se realizaron análisis estadísticos para comparar los resultados obtenidos de las plántulas reinoculadas con *B. cabrialesii* P35 vs las plántulas control, así como de las plántulas reinoculadas vs plántulas inoculadas por primera vez. En ambas comparaciones, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados (altura y diámetro de la plántula, peso y longitud de la raíz, peso del cuerpo aéreo y peso de la plántula completa). Posiblemente esto se deba a que el proceso de reinoculación de las raíces de las plántulas las sometió a mucho estrés, causando más daño que mejora en cuanto al efecto promotor del crecimiento vegetal ocasionado por la bacteria. Tal vez una reinoculación en la que sólo se asperjara el sustrato en la zona cercana a la base de las plántulas, podría dar mejores resultados para el caso de los ensayos de reinoculación.

2. Evaluación de la capacidad PGPR de *B. cabrialesii* P35 en semillas de *E. platyacanthus*

El porcentaje de germinación obtenido en las semillas tratadas con *B. cabrialesii* P35 fue de 92.5%, mientras que el tratamiento control alcanzó solamente el 80% después de 28 días de cultivo (Figura 4). No obstante, a pesar de las diferencias numéricas, el análisis estadístico reveló que no hay diferencia significativa entre el porcentaje de germinación ($p=0.1045$) de las semillas de *E. platyacanthus* inoculadas con *B. cabrialesii* P35, respecto a las semillas control (tratadas con solución salina).

No se encontró información respecto al uso específico de *Bacillus cabrialesii* en ensayos de germinación, sin embargo, el género *Bacillus* ha sido probado en algunas especies vegetales como el *Agave victoriae-reginae*, donde se ha reportado un efecto positivo en la germinación (Castillo-Reyes *et. al.*, 2022). Castillo-Reyes *et. al.* (2014) evaluaron el efecto de distintos microorganismos (*Trichoderma spp.*, rizobacterias halófitas, *Glomus intraradices* y *Bacillus spp.*) como promotores de la germinación en semillas de *E. platyacanthus*, considerando 3 factores: lavado de la semilla, forma de incorporación de las bacterias y uso de cubierta protectora de humedad. En el caso de semillas sin lavar, las bacterias adheridas a la semilla y sin el uso de cubierta protectora, no observaron diferencias significativas entre tratamientos y el control, aunque el tratamiento con *Bacillus* fue el segundo con mayor porcentaje de germinación (30%), después de *G. intraradices* (43%). Cuando utilizaron semillas lavadas y desinfectadas, sin una cubierta protectora de humedad y las bacterias adheridas a las semillas, no hubo germinación en ninguno de los tratamientos, por lo que consideraron que la cubierta protectora es indispensable para que ocurra el proceso germinativo al generar un microambiente húmedo, puesto que la disponibilidad de agua es un factor limitante de este proceso. Derivado de estos experimentos, concluyeron que los resultados muestran un mejor efecto al utilizar semillas lavadas, adherir las bacterias directamente a las semillas y utilizar una cubierta protectora de la humedad.

En el presente trabajo, se utilizaron variables similares con las que se obtuvieron los mejores porcentajes de germinación en el trabajo antes descrito: semillas lavadas e inoculadas directamente con las bacterias, además de controlar la humedad en las placas de agar-agua en que se cultivaron. La germinación fue más rápida en las semillas inoculadas con la suspensión bacteriana que en el control. Siete días después de la inoculación se registró

la germinación del 15% de las semillas inoculadas con *B. cabrialesii* P35, mientras que las semillas control comenzaron a germinar el día 12, momento en que se registró el 7.5% de semillas germinadas (Figura 4).

En el trabajo de Gómez-Serrano *et. al.* (2021), en donde no se utilizaron inoculantes bacterianos, se reportó el inicio de la germinación de semillas de *E. platyacanthus* en la segunda semana después de haber sido sembradas en medio nutritivo Murashige & Skoog (a la mitad de la concentración) y con un tratamiento pre-germinativo de agua destilada durante 24 h. Este resultado es similar al obtenido en la presente investigación para las plántulas control (sin inoculantes bacterianos) donde se inició la germinación en el día 12 (Figura 4), es decir en la segunda semana de cultivo. Debido a lo anterior, se puede afirmar que el tratamiento de las semillas de *E. platyacanthus* con la suspensión bacteriana de *B. cabrialesii* P35 permite la germinación temprana de las semillas en, al menos, una semana.

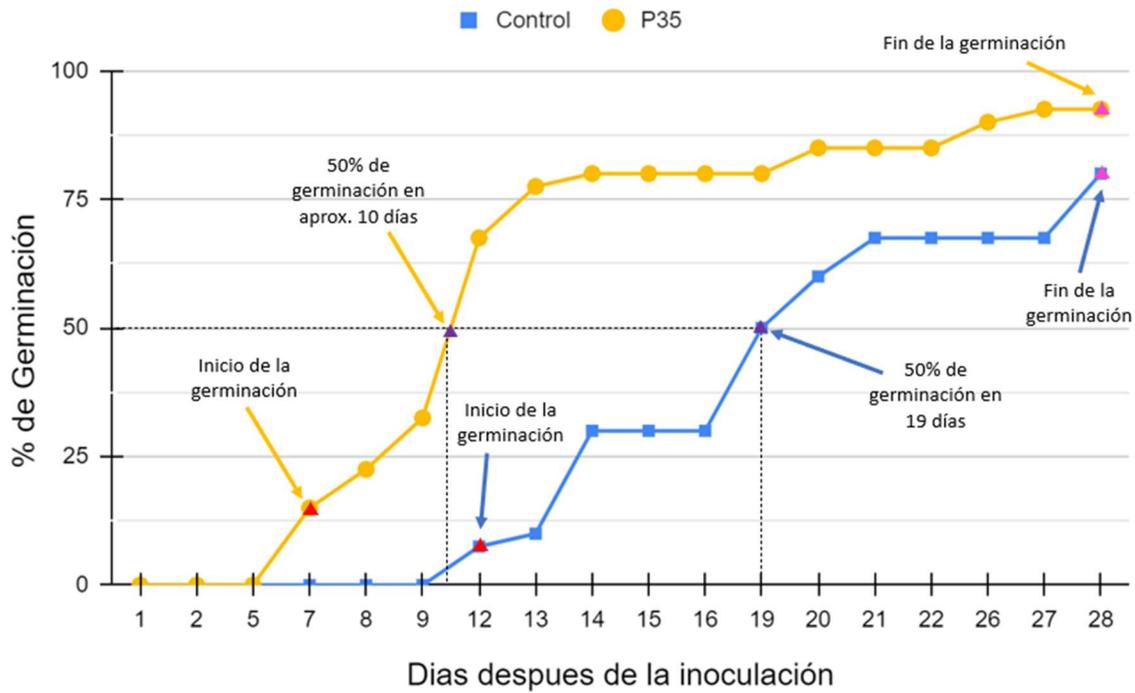


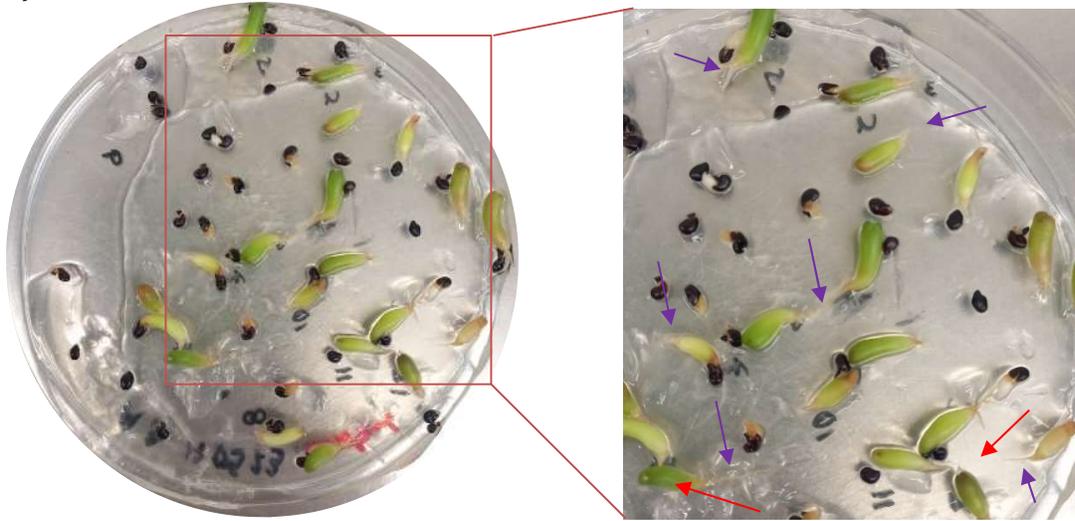
Figura 4. Comparación del porcentaje de germinación de semillas de *E. platyacanthus* control e inoculadas con *Bacillus cabrialesii* P35 a través del tiempo. El gráfico muestra las semillas inoculadas con *B. cabrialesii* P35 en color amarillo y las semillas control en color azul; los triángulos rojos indican el inicio de la germinación (días 7 y 12, respectivamente), los morados indican el punto en el que se alcanzó el 50% de la germinación (días 10 y 19, respectivamente) y los de color rosa el fin del experimento para ambos tratamientos (día 28). La germinación de las semillas tratadas con *B. cabrialesii* P35 inició el día 7 después de la inoculación (15% de semillas germinadas), a los 10 días alcanzó el 50% de la germinación; se obtuvo un 92.5% de germinación total a los 28 días. Las semillas del tratamiento control iniciaron la germinación el día 12 después de la inoculación (7.5% de semillas germinadas), a los 19 días alcanzó el 50% de la germinación; se obtuvo un 80% de germinación total al final del experimento.

Laclette *et. al.* (2014) realizaron un ensayo de germinación con semillas de *Ferocactus hystrix*, una cactácea globular como *E. platyacanthus*, donde el parámetro que consideraron para calcular la velocidad de germinación fue el intervalo de tiempo necesario para que el 50% de las semillas germinaran. Basándonos en esta referencia, calculamos que la velocidad de germinación para las semillas de *E. platyacanthus* tratadas con *B. cabrialesii* P35 fue de aproximadamente 10 días, mientras que para el tratamiento control fue de 19 días (Figura 5). Se puede observar más notoriamente el efecto de *B. cabrialesii* P35 en los primeros días del proceso de germinación, sin embargo, a partir del día 20, comienza a reducirse esta diferencia con el control hasta el término del experimento, por lo que podría concluirse que *B. cabrialesii* P35 acelera el inicio de la germinación, aunque no necesariamente participe activamente en el establecimiento de las plántulas. Castillo-Reyes *et. al.* (2014) mencionan que este efecto puede deberse a que los microorganismos actúan como promotores e inductores de la germinación al provocar el rompimiento de la testa y producir hormonas necesarias para dicho proceso.

Estos datos respecto a la germinación son relevantes para la propagación masiva de *E. platyacanthus* ya que la inoculación con *B. cabrialesii* P35 permitiría reducir su tiempo de germinación y, por lo tanto, mejorar la producción de plántulas de esta especie en riesgo puesto que las plántulas con mayor tamaño y desarrollo de sus raíces tienen mayor probabilidad de supervivencia.

Al término de 28 días de cultivo, las plántulas provenientes de semillas tratadas con *B. cabrialesii* P35 mostraron valores de longitud de cuerpo aéreo y raíces superiores a los del tratamiento control. En promedio, las plántulas tratadas con *B. cabrialesii* P35 tuvieron una longitud de raíz de 8 mm y 7 mm de longitud de cuerpo aéreo, además de que se observó el desarrollo de pelos radiculares incipientes, coloración verde del cuerpo aéreo y desarrollo de espinas primigenias (ver figura 5 B), mientras que las plántulas provenientes de las semillas tratadas sólo con solución salina (control) tuvieron una longitud promedio de la raíz de 4 mm y 5 mm de longitud de cuerpo aéreo, la coloración de estas plántulas fue verde pálido y sólo se observó el desarrollo de la raíz primaria, con escaso desarrollo de espinas (ver figura 5 A).

A) Tratamiento control



B) Tratamiento *B. cabrialesii* P35

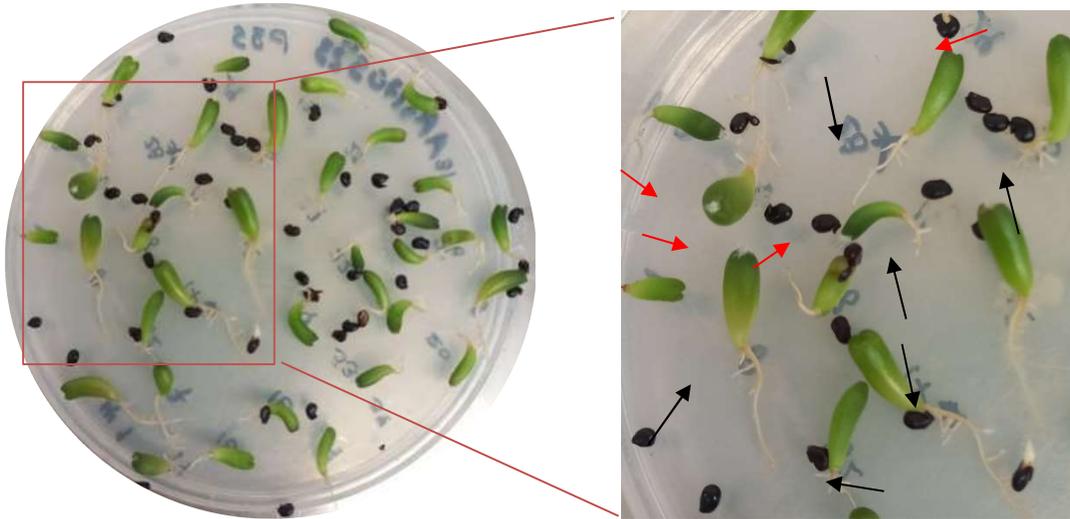


Figura 5. Desarrollo de plántulas de *E. platycanthus* a partir de semillas control e inoculadas con suspensión bacteriana. (A) Plántulas desarrolladas a partir de semillas control (tratadas solo con solución salina). (B) Plántulas desarrolladas a partir de semillas tratadas con *B. cabrialesii* P35. Las flechas moradas señalan las raíces primarias sin desarrollo de otro tipo de raíz; las flechas negras señalan las raíces con desarrollo de raíces secundarias y pelos radiculares; las flechas rojas señalan las espinas primigenias que pueden observarse como manchas blancas.

El porcentaje de supervivencia de las plántulas provenientes de semillas inoculadas con *B. cabrialesii* P35 fue de 83.3 % y de 61.1% para las plántulas del tratamiento control, después de 63 días de trasplante a sustrato. No obstante, a pesar de las diferencias numéricas, el análisis estadístico reveló que no hay diferencia significativa entre el porcentaje de supervivencia ($p=0.1366$) de las semillas de *E. platycanthus* inoculadas con *B. cabrialesii* P35, respecto a las semillas control (tratadas con solución salina).

CONCLUSIONES

1. *Bacillus cabrialesii* P35 ejerció un efecto promotor del crecimiento en las plántulas de *E. platyacanthus* que se inocularon por vez primera al aumentar significativamente la altura (24%, $p=0.01307$), el diámetro (25%, $p=0.00691$), el peso del cuerpo aéreo (94%, $p=0.00723$) y el peso total de la plántula (92%, $p=0.00930$), así como el peso de la raíz (86%, $p=0.04322$) al aumentar el desarrollo de raíces secundarias y pelos radiculares, respecto al tratamiento control. Las plántulas reinoculadas no mostraron un aumento significativo de los parámetros evaluados respecto al control, lo que se atribuye al proceso de reinoculación que las sometió a un estrés excesivo, por lo que la recomendación para ensayos futuros es realizar una reinoculación en la que sólo se asperjara el sustrato en la zona cercana a la base de las plántulas.
2. *Bacillus cabrialesii* P35 no provocó un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de germinación de las semillas tratadas, sin embargo, sí aceleró 5 días el inicio de la germinación y redujo a la mitad el tiempo en el que se alcanzó el 50% de la germinación de las semillas, respecto al tratamiento control. En cuanto a la supervivencia no provocó un aumento estadísticamente significativo, sin embargo, por las características que desarrollaron las plántulas provenientes de las semillas inoculadas (mayor longitud de raíces, desarrollo de raíces secundarias, mayor longitud de cuerpo aéreo y desarrollo de espinas) se esperaba que, al ser trasplantadas, tuvieran una mayor probabilidad de supervivencia.

Ambas evaluaciones permiten inferir que *B. cabrialesii* P35 tiene un efecto promotor del crecimiento sobre *E. platyacanthus* ya que acelera el proceso de germinación y estimula su crecimiento permitiendo obtener plántulas más vigorosas en un menor tiempo, por lo que podría influir en la supervivencia de esta cactácea. Esto es muy importante principalmente para aquellas plántulas que se propagan en invernaderos y que tienen como objetivo la reintroducción a su hábitat natural, pudiendo aumentar la tasa de éxito de supervivencia de las plántulas trasplantadas en esas áreas, de esta manera podría pensarse que *B. cabrialesii* P35 funcionaría como un bioinoculante no solo para esta cactácea si no para otras especies vegetales.

REFERENCIAS

- Alanís, G. J., & Velazco, C. G. (2008). Importancia de las cactáceas como recurso natural en el noreste de México. *Ciencia UANL*, 11(1), 5-11. <https://dialnet.unirioja.es/download/articulo/2565716.pdf>
- BASHAN, Y., PUENTE, M. E., SALAZAR, B., DE-BASHAN, L. E., BACILIO, M., HERNANDEZ, J.-P., LEYVA, L. A., ROMERO, B., VILLALPANDO, R., & BETHLENFALVAY, G. J. (2005). Reforestación de tierras erosionadas en el desierto: el papel de las bacterias promotoras de crecimiento en plantas y la materia orgánica. *Suelos Ecuatoriales*, 35, 70-77.

- Bashan, Y., De-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernández, J. P. R. (2013). Advances in Plant growth-promoting Bacterial Inoculant Technology: Formulations and Practical Perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*, 378(1-2), 1-33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>
- Bravo-Hollis, H. (1978). *Las cactáceas de México* (2.a ed., Vol. 1). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Briones, O., Búrquez, A., Martínez-Yrizar, A., Pavón, N. P., & Perroni, Y. (2018). Biomasa y productividad en las zonas áridas mexicanas. *Madera Y Bosques*, 24. <https://doi.org/10.21829/myb.2018.2401898>
- Castañeda-Romero, M., Luna-Contreras, M., Vela-Godínez, D., Montoya-Santiago, G., González-Bermúdez, A., Martínez, R., & Esperón-Rodríguez, M. (2016). Nota sobre la estructura poblacional de *Echinocactus platyacanthus* (Cactaceae) en la Reserva de la Biósfera «Barranca de Metztitlán», Hidalgo, México. *Acta botánica Mexicana*, 115, 65-73. <https://doi.org/10.21829/abm115.2016.1112>
- Castillo-Reyes, F. D. H., Chaparro, J. D. S., Estrada, S., & Canul-Ku, J. (2014). EFECTO DE MICROORGANISMOS EN LA PROMOCIÓN DE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE LA CACTÁCEA *Echinocactus platyacanthus* LINK & OTTO. *Interciencia*, 39(12), 863-867. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5512711>
- Castillo-Reyes, F., Castillo, Q. D., Saénz, C. J. E., Rueda, S. A., & Saénz, R. T. (2022). Efectos del pretratamiento con *Trichoderma* y *Bacillus* en la germinación de semillas de *Agave victoriae-reginae* T. Moore Effects of *Trichoderma* and *Bacillus* pre-treatments on the germination of *Agave victoriae-reginae* T. Moore seeds. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 13(69), 56-72.
- CONAZA. (2021) https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/831875/Vision_de_la_CONAZA_2020-2050.pdf. Consultado el 28 de septiembre de 2023
- Corrales, L., Caycedo, L., Gómez, M., Ramos, S., & Rodríguez, J. (2017). *Bacillus* spp: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. *Nova*, 15(27), 45-65. <https://doi.org/10.22490/24629448.1958>
- De Los Santos-Villalobos, S., Robles, R. I., Parra-Cota, F. I., Larsen, J., Lozano, P., & Tiedje, J. M. (2019). *Bacillus cabrialesii* sp. nov., an endophytic plant growth promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) in the Yaqui Valley, Mexico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(12), 3939-3945. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003711>
- Figuroa-Brambila, K.M.; Escalante-Beltrán, A.; Montoya-Martínez, A.C.; Díaz-Rodríguez, A.M.; López-Montoya, N.D.; Parra-Cota, F.I.; de los Santos-Villalobos, S. *Bacillus cabrialesii*: Five Years of Research on a Novel Species of Biological Control and Plant Growth-Promoting Bacteria. *Plants* 2023, 12, 2419. <https://doi.org/10.3390/plants12132419>
- Flores, C. (2016). I Reunión Nacional de Zonas Áridas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 39(1), 7-8. <https://www.redalyc.org/pdf/610/61045279003.pdf>

- Gómez-Serrano, G., Martínez, J., Arreguín-Sánchez, M., & García, F. (2021). Germinación y crecimiento de *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto (Cactaceae). *Polibotánica*, 0(52), 117-133. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.52.9>
- Granados-Sánchez, D., Hernández-García, M. T., Vázquez-Alarcón, A., & Ruíz-Puga, P. (2012). LOS PROCESOS DE DESERTIFICACIÓN Y LAS REGIONES ÁRIDAS. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, XIX(1), 45-66. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2011.10.077>
- Jiménez, C. L. (2011). Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Revista Digital Universitaria* (1607 - 6079). Vol. 12, No. 1 (2011), 12(1), 1-21.
- Kashyap, B. K., Solanki, M. K., Pandey, A., Prabha, S., Kumar, P., & Kumari, B. (2019). *Bacillus* as Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Promising Green Agriculture Technology. Springer Singapore eBooks, 219-236. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6040-4_11
- Laclette, E. L., Barrera, G. X. M., Azpiri, H. S., Sandoval, L. G. H., & Escobar, A. G. (2014). Estudio de germinación y crecimiento en semillas de *Ferocactus histrix* (De Candolle). *Cactáceas y succulentas mexicanas*, 59(3). <https://biblat.unam.mx/hevila/Cactaceasysucculentasmexicanas/2014/vol59/no3/2.pdf>
- Rojas-Padilla, J. R., Encinas, L. A. C., Montoya, R. I. R., & De Los Santos-Villalobos, S. (2020). Promoción de crecimiento en trigo (*Triticum turgidum* L. subsp. durum) por la co-inoculación de cepas nativas de *Bacillus* aisladas del Valle del Yaqui, México. *Nova Scientia*, 12(24). <https://doi.org/10.21640/ns.v12i24.2136>
- Rojas-Padilla, J., De-Bashan, L. E., Parra-Cota, F. I., Rocha, J., & De Los Santos-Villalobos, S. (2022). Microencapsulation of bacillus strains for improving wheat (*Triticum turgidum* subsp. durum) growth and development. *Plants*, 11(21), 2920. <https://doi.org/10.3390/plants11212920>
- Salinas-Virgen, L. (2015). Aislamiento y caracterización mediante técnicas microbiológicas y de biología molecular de bacterias promotoras del crecimiento obtenidas de la rizósfera de la cactácea *Echinocactus platyacanthus* (biznaga dulce) del semidesierto de Querétaro. Departamento de Sistemas Biológicos, UAM-Xochimilco, México. Reporte de servicio social.
- Salinas-Virgen, L. (2019). Identificación y caracterización de la actividad PGPR de bacterias rizosféricas y endófitas aisladas de *Echinocactus platyacanthus* (biznaga dulce) creciendo en condiciones silvestres y de invernadero en el semidesierto queretano. [Tesis de maestría]. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Sansinenea, E. (2019). *Bacillus* spp.: As Plant Growth-Promoting Bacteria. *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms*, 225-237. https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3_11
- SEMARNAT (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión,

exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación 30 de diciembre de 2010.

Sivasakthi, S., Usharani, G., & Saranraj, P. (2014). Biocontrol Potentiality of plant Growth Promoting Bacteria (PGPR) - *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: a review. *African Journal of Agricultural Research*, 9(16), 1265-1277. <https://doi.org/10.5897/ajar2013.7914>

Tarango, L. A. (2005). PROBLEMÁTICA Y ALTERNATIVAS DE DESARROLLO DE LAS ZONAS ÁRIDAS Y SEMIÁRIDAS DE MÉXICO. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, IV(2), 17-21. <https://www.redalyc.org/pdf/4555/455545052003.pdf>

Valenzuela-Aragón, B., Parra-Cota, F. I., Santoyo, G., Arellano-Wattenbarger, G. L., & De Los Santos-Villalobos, S. (2018). Plant-assisted selection: a promising alternative for in vivo identification of wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) growth promoting bacteria. *Plant and Soil*, 435(1-2), 367-384. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-03901-1>

Velasco-García, M. V., Arroyo, D. G. H., Gutiérrez, L. M., Martínez, C. R. C., Vallejo-Reyna, M. Á., & García-Campusano, F. (2022a). Crioconservación de semillas de cedrela odorata L.: germinación y establecimiento temprano en vivero. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 13(69), 31-55. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v13i69.1198>

Villa-Rodríguez, E., Parra-Cota, F. I., Castro-Longoria, E., López-Cervantes, J., & De Los Santos-Villalobos, S. (2019). *Bacillus subtilis* TE3: a promising biological control agent against *bipolaris sorokiniana*, the causal agent of spot blotch in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*). *Biological Control*, 132, 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.02.012>

ANEXOS

Anexo A. Preparación de la suspensión bacteriana de *Bacillus cabrialesii* P35.

La suspensión bacteriana se preparó de la siguiente manera:

1. Se sembraron por estría 10 μ L de un cultivo criopreservado de *B. cabrialesii* P35 en medio sólido TY (Anexo B). Se incubó durante 24 horas a 37°C.
2. De este cultivo se tomaron dos colonias aisladas:
 - a) una para hacer tinción Gram
 - b) otra para hacer un cultivo líquido en medio TY (5mL) que se incubó durante 24 horas a 37°C, en agitación orbital de 280 rpm, y que se utilizó como inóculo para el siguiente paso.
3. El medio TY líquido (250mL) se inoculó con 1 mL del cultivo líquido de *B. cabrialesii* P35 previamente preparado; se incubó a 37°C durante 24 horas con agitación orbital constante a 280 rpm.

4. El cultivo de *B. cabrialesii* P35 se centrifugó en tubos falcón de 50 mL a 3,000 rpm, durante 5 minutos, para formar un pellet celular. El proceso se repitió hasta terminar de centrifugar los 250 mL de cultivo.
5. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 10 mL de solución salina (NaCl al 0.9%) estéril por agitación con vórtex.
6. Se tomó 1 mL de esta suspensión bacteriana y se midió su densidad óptica a 600 nm (D_{600}), ajustándola a un valor de 0.6 en un volumen de 120 mL.
7. La suspensión bacteriana ajustada se utilizó para inocular las semillas y las raíces de las plántulas de *E. platyacanthus*.

Anexo B. Preparación de medios y soluciones.

1. Medio TY sólido.

- Triptona5 g/L
- Extracto de levadura3 g/L
- CaCl₂1 g/L
- Agar bacteriológico12 g/L
- Agua cbp

Esterilizar en autoclave a 120°C y 15 libras de presión durante 15 minutos.

Verter 20 mL del medio en cada caja Petri y dejar solidificar en la campana de flujo laminar.

2. Medio TY líquido.

- Triptona5 g/L
- Extracto de levadura3 g/L
- CaCl₂1 g/L
- Agua cbp

Colocar 5 mL por tubo y esterilizar en autoclave a 120°C y 15 libras de presión durante 15 minutos.

3. Agar-agua

- Agar bacteriológico 12 g/L
- Agua cbp

Esterilizar en autoclave a 120°C y 15 libras de presión durante 15 minutos.

Verter 20 mL del medio en cada caja Petri y dejar solidificar en la campana de flujo laminar.

4. Solución salina al 0.9% (NaCl 0.9%)

Para preparar 150 mL de agar-agua al 1.2%:

- 1.8 g de agar bacteriológico
- Agua cbp

Se esteriliza a 120°C y 15 libras de presión durante 15 minutos.

5. Glicerol 50%

- Glicerol 50 mL/100 mL de solución

- Agua 50 mL/ 100 mL de solución

Se esteriliza a 120°C y 15 libras de presión durante 15 minutos.

6. Solución de hipoclorito 0.5% (10mL)

- Solución de hipoclorito de sodio comercial 1 mL
- 9 mL de agua

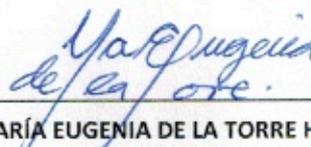
Anexo C. Lavado y desinfección de semillas de *E. platyacanthus*.

1. Se colocaron 80 semillas de *E. platyacanthus* en un tubo eppendorf de 1.5mL con solución comercial de hipoclorito de sodio en una dilución 1:10 en agua; se agitaron vigorosamente en vórtex durante 2 minutos.
2. Se desechó la solución y se realizaron 3 enjuagues con solución salina (NaCl 0.9%) estéril. Se agitó en vórtex durante cada lavado.
3. Se sembró en medio sólido TY una alícuota de la solución resultante del último lavado, para verificar que las semillas estuvieran libres de microorganismos.
4. Para el tratamiento con *B. cabrialesii* P35, se incubaron 40 semillas en 2 mL de suspensión bacteriana previamente ajustada; para el control negativo, se incubaron 30 semillas en 2 mL de solución salina estéril. Ambos tratamientos se llevaron a cabo a temperatura ambiente, durante 2 horas, en tubos microtubos de 2 mL
5. Dentro de la campana de flujo laminar se retiraron tanto la suspensión bacteriana como la solución salina y se dejaron secar las semillas, por separado, sobre papel filtro estéril.

Vo. Bo. del contenido académico del Informe de Conclusión de Servicio Social titulado: "Evaluación del efecto promotor del crecimiento de *Bacillus.cabrialesii* P35 sobre plántulas y semillas de *Echinocactus platyacanthus* (biznaga dulce)"



DR. HUGO CÉSAR RAMÍREZ SAAD
No. Eco. 8642
Depto. Sistemas Biológicos.
Asesor Interno



DRA. MARÍA EUGENIA DE LA TORRE HERNÁNDEZ
Catedrática CONACYT - UAM XOCHIMILCO
Cédula doctorado 8273669
Asesora externa