

## Potencialidades de la diversidad bacteriana asociada al trigo (*Triticum aestivum* L.) para estimular su crecimiento

Yoania Ríos Rocaful<sup>1</sup>, Marisel Ortega García<sup>2</sup>, Janet Rodríguez Sánchez<sup>3</sup> & Bernardo Dibut Álvarez<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ORCID <https://orcid.org/0000-0003-1774-0868>, INIFAT, Departamento de Recursos Genéticos Microbianos y Productos Bioactivos, La Habana, Cuba, <sup>2</sup>ORCID <https://orcid.org/0000-0002-8076-2675>, INIFAT, Dirección Científica, La Habana, Cuba, <sup>3</sup>ORCID <https://orcid.org/0000-0002-8974-9215>, INIFAT, Dirección Adjunta, La Habana, Cuba, <sup>4</sup>ORCID <https://orcid.org/0000-0002-5537-8591>, INIFAT, Departamento de Recursos Genéticos Microbianos y Productos Bioactivos, La Habana, Cuba.

Citación: Ríos Rocaful, Y., Ortega García, M., Rodríguez Sánchez, J., & Dibut Álvarez, B. (2022). Potencialidades de la diversidad bacteriana asociada al trigo (*Triticum aestivum* L.) para estimular su crecimiento. *Agrisost*, 28, 1–9. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7867918>

Recibido: 11 noviembre 2021

Aceptado: 17 marzo 2022

Publicado: 24 marzo 2022

Financiamiento: No se declara.

Conflictos de interés: No se declaran conflictos de interés.

Correo electrónico: [dpagrobiotec@inifat.co.cu](mailto:dpagrobiotec@inifat.co.cu), [yrrocafull@gmail.com](mailto:yrrocafull@gmail.com)

### Resumen

**Contexto:** Algunos microorganismos estimulan el crecimiento de las plantas, por lo que en la investigación se trabajó con la diversidad bacteriana asociada al cultivo del trigo para seleccionar cepas promisorias para su uso agrícola.

**Objetivo:** Seleccionar de la diversidad bacteriana asociadas a plantas de trigo, cepas promisorias para estimular el crecimiento de este cultivo.

**Métodos:** Se aislaron bacterias desde la rizosfera y el interior de plantas de trigo (cultivares Cuba C 204 e I 399). Se caracterizó en condiciones in vitro su potencial para fijar nitrógeno, solubilizar nutrientes y su actividad antagonista frente a *Fusarium* sp y *Curvularia lunata*. Se inocularon las cepas en semillas de trigo en condiciones semicontroladas y se evaluó su efecto sobre indicadores del crecimiento.

**Resultados:** Se aislaron diferentes microorganismos, dentro de ellos cuatro cepas categorizadas como Bacillus, cuatro Azotobacter y dos como Azospirillum, según su morfo-fisiología. Todos estos microorganismos fijaron nitrógeno atmosférico, y a excepción de una cepa, solubilizaron nutrientes y presentaron actividad antagonista frente a *F. graminearum*, *F. chlamyosporum*, *F. oxysporum* y *C. lunata*. Su inoculación en trigo demostró que es posible utilizar la diversidad bacteriana asociada a la especie vegetal para estimular el crecimiento de plántulas de 21 días de los cultivares Cuba C 204 e I 399.

**Conclusiones:** Asociados a las plantas de trigo existe una diversidad microbiana con potencial para estimular el crecimiento en condiciones in vitro e in vivo, algunas de ellas promisorias para la obtención de un nuevo bioproducto de uso agrícola que incremente el rendimiento del cultivo bajo las condiciones de Cuba.

**Palabras clave:** gramíneas, microorganismos, biofertilizante.

## Potentialities of the bacterial diversity associated to the wheat (*Triticum aestivum* L.) to stimulate the growth of this vegetable species

### Abstract

**Context:** Some microorganisms stimulate the growth of plants for what in the investigation was work with bacteria diversity associated to wheat to select promissory strains for its agricultural use.

**Objective:** To select of the bacterial diversity associated to wheat plants, promissory strains to stimulate the growth of this crop.

**Methods:** Bacteria were isolated from rhizosphere and inside of wheat plants (Cuba C 204 and I 399 cultivars). It was characterized under in vitro conditions their potential to fix nitrogen, solubilize nutritious

and their antagonistic activity against *Fusarium* sp and *Curvularia lunata*. The strains were inoculated in wheat seeds under semicontrolled conditions and their effect on indicators of the growth was evaluated.

**Results:** Different microorganisms were isolated, inside them four strains categorized as *Bacillus*, four *Azotobacter* and two as *Azospirillum*, according to their morfo-physiology. All these microorganisms fixed atmospheric nitrogen, and to exception of one strain, they solubilize nutritious and they presented antagonistic activity against *F. graminearum*, *F. chlamyosporum*, *F. oxysporum* and *C. lunata*. Its inoculation in wheat demonstrated that it is possible to use the bacterial diversity associated to the vegetable species to stimulate the growth of 21 days plants of the cultivars Cuba C 204 and I 399.

**Conclusions:** Associated to the wheat plants exists a microbial diversity with potential to stimulate the growth under in vitro and in vivo conditions, promissory some of them for the obtaining of a new bioproduct for agricultural use that increase the crop yield in Cuba conditions.

**Key words:** *gramineae, microorganisms, biofertilizer.*

## Introducción

Cuba invierte grandes sumas de dinero en la importación de granos para la alimentación humana y animal, con costos cada vez más altos (Martínez et al., 2016). Por esta razón, el país utiliza diferentes estrategias para incrementar los rendimientos de este tipo de cultivos, entre las que se incluye el aumento de la superficie sembrada y el uso de variedades con un mayor potencial de rendimiento; sin embargo, aún no se alcanzan las producciones necesarias para satisfacer la demanda de la población. Una herramienta que podría insertarse en esta tarea son las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), las que pueden constituir principios activos de bioproductos de uso agrícola que se identifican como tecnologías amigables con la salud del suelo y el medio ambiente (González & Fuentes, 2017).

El microbioma de las plantas incluye a microorganismos filosféricos, endófitos y rizosféricos. Dentro de él se insertan las PGPB, bacterias que estimulan el crecimiento de los cultivos mediante la activación de mecanismos como la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de nutrientes, la producción de fitohormonas, el control de organismos fitopatógenos, entre otros (Yadav, 2017). Varias investigaciones demuestran el efecto positivo de la aplicación de PGPB en trigo (*Triticum aestivum* L.) (Alves et al., 2017). Sin embargo, en Cuba ninguno de los biofertilizantes registrados es específico para esta especie vegetal (Departamento de Suelos y Fertilizantes, 2018), lo que limita el uso en la práctica de los microorganismos dentro de la agrotecnia propuesta para este cultivo.

Como contribución a la obtención de un nuevo bioproducto de uso agrícola para el trigo en esta investigación se aislaron cepas bacterianas asociadas a esta especie vegetal y de ellas se seleccionaron microorganismos promisorios para estimular el crecimiento del cultivo. De esta forma se demostró que asociados a las plantas de trigo existe una diversidad microbiana con características favorables para constituir el principio activo de bioproductos de uso agrícola para esta especie vegetal.

## Materiales y Métodos

**Aislamiento y selección de microorganismos:** se utilizaron plantas de 30 días de los cultivares de trigo Cuba C 204 e I 399 y suelo rizosférico asociado a estas. Las muestras se manipularon en el Laboratorio de Conservación de Bacterias del Departamento de Recursos Genéticos Microbianos y Productos Bioactivos, del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt”, INIFAT. En el caso de las plantas, se separaron fragmentos de 1 cm de raíces, tallos y hojas, que se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 4% y se maceraron. La savia extraída se inoculó en los medios de cultivo LGI semisólido (Cavalcante & Döbereiner, 1988) y Agar Nutriente (BIOCEN). Las muestras de suelo (10 g) se disolvieron en 90 mL de agua destilada estéril para realizar diluciones seriadas (Madigan et al., 2018) que se inocularon en los medios de cultivo Agar Nutriente (BIOCEN), Asbhy, NFB y YMA (estos tres últimos semisólidos y citados por Martínez et al., 2006). Tanto las muestras de savia como de suelo antes de ser inoculadas en el medio de cultivo Agar Nutriente se colocaron a 100 °C de temperatura durante 10 minutos. La purificación de los microorganismos se realizó mediante siembras por agotamiento en los mismos medios de cultivo utilizados para el aislamiento. La temperatura de incubación osciló entre 28 y 30 °C y el tiempo dependió del medio de cultivo (24 horas para el Agar Nutriente, 48-72 horas para los medios Asbhy y YMA y 120 horas para el LGI y el NFB).

Se seleccionaron los microorganismos con las características morfo-fisiológicas correspondientes a los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter* y la clase *Bacilli*. Las características micromorfológicas y tintoriales se verificaron mediante una tinción de Gram (Madigan et al., 2018), en tanto la observación de las colonias se realizó en un microscopio estereoscópico (CARLZEISS JENA, aumento de 10X). Los microorganismos aislados en los medios de cultivo NFB y YMA se inocularon, además, en los medios de cultivo Rojo Congo para *Azospirillum* y YMA con Rojo Congo (ambos citados por Martínez et al., 2006), respectivamente. Como indicadores fisiológicos a

todos los aislados se les determinó la presencia de las enzimas catalasa y citocromo oxidasa, el uso del citrato como fuente de carbono y de glucosa según la prueba de crecimiento en el medio Kliger, la capacidad de hidrólisis de almidón y gelatina, y la motilidad (Harrigan & McCance, 1968). La temperatura de incubación siempre osciló entre 28 y 30 °C.

**Caracterización de los microorganismos como estimuladores del crecimiento vegetal:** se determinó la capacidad para fijar nitrógeno atmosférico de forma cualitativa, a partir de los criterios de Baldani et al. (2014). Para ello, las cepas se inocularon en el medio de cultivo Asbhy (citado por Martínez et al., 2006) carente de nitrógeno combinado y se evaluó la presencia o no de crecimiento bacteriano bajo estas condiciones. El medio de cultivo constituyó el control negativo. También se cuantificó el potencial de los microorganismos para solubilizar de fosfato de calcio, hierro y aluminio y potasio, a partir de la medición con un pie de rey (0.05 mm de error) del halo de solubilización formado en el medio de cultivo Pikosvkaya (citado por Martínez et al., 2006) suplementado con estos nutrientes. Por último, se determinó la actividad antagonista de las cepas bacterianas ante *Fusarium graminearum* (cepa 3991), *Fusarium chlamydosporum* (cepa 2022), *Fusarium oxysporum* (cepa 3114) y *Curvularia lunata* (cepa 3835). Para ello se utilizó el método descrito por Grobelak et al. (2014). Se usaron suspensiones celulares en agua destilada estéril de las bacterias donde estas presentaron una concentración de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Con 1 mL de la suspensión se inocularon, mediante una siembra a profundidad, 10 mL del medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) (BIOCEN). Después de 4 horas, en el medio de cultivo se colocó un disco de 7 mm de diámetro de cada una de las cepas de hongos, todas procedentes de la Colección de Hongos de Cultivos Puros de Hongos del INIFAT (Colección 853 de la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC)). Se incluyó un tratamiento testigo donde solamente se inocularon las cepas fúngicas. En todos los tratamientos se midió el diámetro del micelio fúngico (DM), con un pie de rey (0,05 mm de error), a los 7 días de incubación y se calculó el porcentaje de inhibición micelial (IM) ( $\text{IM} (\%) = \frac{\text{dmc} - \text{dt}}{\text{dmc}} \times 100$ , donde dmc: Diámetro del micelio del control (testigos) y dt: Diámetro del micelio con los tratamientos). La temperatura de incubación osciló entre 28 y 30 °C.

**Evaluación del efecto de la aplicación de los microorganismos en dos cultivares de trigo:** el estudio se realizó entre los meses de enero y marzo del año 2021. Se utilizaron semillas de trigo de los cultivares Cuba C 204 e I 399, procedentes del Banco de Germoplasma del INIFAT. Para el bioensayo se usaron cepellones de 40 alveolos con suelo Ferralítico Rojo Lixiviado, Gléyico y Nodular Ferruginoso (A.

Hernández et al., 2015). Las semillas de trigo se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 4 % y se enjuagaron con abundante agua destilada estéril antes de su siembra. Posteriormente, se inocularon las cepas bacterianas de forma independiente y por aspersión al suelo encima de la semilla, a razón de 1 mL por alveolo de una suspensión celular en agua destilada estéril de una concentración microbiana de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Se dio seguimiento diario al crecimiento de las plantas durante 21 días, con riego y observación de su estado sanitario. Posteriormente, se extrajeron las plántulas y se midieron los siguientes indicadores de crecimiento: altura, diámetro del tallo, largo de la raíz, número de hojas y masa fresca y seca de la planta. Para determinar la altura y largo de la raíz se utilizó una regla graduada, para el diámetro del tallo un pie de rey (0,05 mm de error) y para la masa, una balanza DS 3K0.01S (0,01 g de error).

**Diseño experimental y análisis estadístico:** todos los ensayos se realizaron bajo un Diseño Completamente Aleatorizado. En condiciones de laboratorio se utilizaron cinco réplicas por cada cepa o tratamiento, mientras que en el bioensayo se usaron 20 plantas para cada tratamiento (cepas y testigo) en las dos réplicas que se realizaron. Se utilizaron todas las mediciones para el procesamiento estadístico, después de comprobar que no existían diferencias entre una réplica y otra. Se comprobó la normalidad y homogeneidad de las varianzas de los resultados obtenidos con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov, Cochran C, Hartley y Bartlett, y posteriormente se realizaron Análisis de Varianza y se compararon las medias mediante la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan (5 % de probabilidad de error). Para el procesamiento estadístico se usó el programa STATGRAPHICS Plus versión 5.0.

## Resultados y Discusión

A partir del muestreo que se realizó a las plantas de trigo y el suelo asociado a estas se purificaron 40 microorganismos, obteniéndose 10 aislados más desde el cultivar Cuba C 204, con respecto al I 399 y una mayor representatividad de los microorganismos purificados en el medio de cultivo NFB, aunque también se destacó el medio Asbhy en el caso del cultivar Cuba C 204. De estos microorganismos se seleccionaron 10 por presentar las características morfo-fisiológicas que se describen para los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Bacillus* (Tabla 1).

**Tabla 1. Distribución de los aislamientos de microorganismos realizados desde fragmentos de plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) y suelo rizosférico asociado**

Medio de cultivo	Microorganismos aislados		Microorganismos seleccionados	
	Cultivar Cuba C 204	Cultivar I 399	Cultivar Cuba C 204	Cultivar I 399
Asbhy	11	3	3	1
NFB	11	6	1	1
Agar Nutriente	1	3	1	3
LGI	0	0	0	0
YMA	2	3	0	0
Total	25	15	5	5

Por su asociación con gramíneas se destacan, entre otras PGPB, los representantes de *Bacillus*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Clostridium* y *Gluconacetobacter* (de la Fé et al., 2015). Es por ello que el aislamiento se dirigió a algunos de estos géneros con el uso de medios selectivos recomendados para *Azotobacter*, *Azospirillum* (Martínez et al., 2006) y *Gluconacetobacter* (Cavalcante & Döbereiner, 1988). En el caso particular del grupo de los rizobios, aunque históricamente se han asociado a las leguminosas, en los últimos años se demostró su asociación con gramíneas, cultivos donde puede ejercer con su inoculación un efecto positivo en el crecimiento (Vital et al., 2015), de ahí que se incluyeran en la investigación.

El aislamiento de más microorganismos asociados a un cultivar con respecto a otro, evidenciado también en este estudio, se debe a la compleja relación entre la planta y los microorganismos y a su especificidad, donde la planta regula la población microbiana mediante cambios fisiológicos y los exudados radicales producidos durante su crecimiento y liberados al medio circundante (Chinakwe et al., 2019). Es por ello que aun cuando los cultivares pertenezcan a la misma especie vegetal pueden tener asociada un microbiota diferente.

Para la selección de los microorganismos se valoraron sus características morfo-fisiológicas y su correspondencia con los géneros hacia donde se dirigió la investigación. En el caso del medio de cultivo Asbhy se mantuvieron en el estudio los aislados con colonias circulares, mucosas, beige-traslúcida, con células como bacilos cortos Gram negativos, con una respuesta oxidasa y catalasa positiva, características que se corresponden con el género *Azotobacter* (Brenner et al., 2005). Por su parte, el criterio de selección para los microorganismos aislados en el medio de cultivo NFB fue una micromorfología como bacilos cortos Gram negativo, con colonias blancas, respuesta oxidasa y catalasa positiva y que formaron colonias rojo escarlata en el medio de cultivo Rojo Congo, todas ellas características típicas del género *Azospirillum* (Piña et al., 2016). El otro grupo incluido en la selección final fue *Bacillus*. Aunque su clasificación taxonómica es actualmente muy compleja, ya que no

resulta suficiente la secuenciación del gen 16 S rRNA y se recomienda que se secuencien otros genes para asignar la identidad a nivel de género y especie (Ruiz-Sánchez et al., 2016), se consideran criterios primarios de identificación la respuesta positiva a la tinción de Gram, la presencia de esporas y de la enzima catalasa (Rojas et al., 2016), aspectos que coinciden con los resultados de las pruebas realizadas a los microorganismos purificados en el medio de cultivo Agar Nutriente.

No se seleccionó ningún aislado purificado en el medio de cultivo YMA, ya que presentaron una respuesta Gram positiva, alcalinizaron el medio de cultivo con bromotimol azul, o absorbieron el colorante Rojo Congo, características que no coinciden con la descripción del género *Rhizobium* (J.L. Hernández et al., 2012; Saldaña, 2017). Tampoco se mantuvieron los microorganismos purificados en el medio de cultivo LGI, ya que mostraron una respuesta positiva ante la tinción de Gram o una coloración blanca en sus colonias, contrario a las características del género *Gluconacetobacter* donde se incluyen bacilos cortos Gram negativos que forman colonias amarillas-naranjas en el medio de cultivo LGI (Cavalcante & Döbereiner, 1988).

Las características morfo-fisiológica de los microorganismos seleccionados y su categorización a partir de estos resultados se muestran en las Tablas 2 y 3. Se puede apreciar la diversidad que existe entre ellos, aun cuando se trate de microorganismos asociados a un mismo grupo taxonómico.

Las 10 cepas bacterianas aisladas desde el trigo que se seleccionaron por sus características morfo-fisiológicas presentaron mecanismos directos de estimulación del crecimiento vegetal. La fijación biológica de nitrógeno atmosférico fue una característica común, pues la totalidad de los microorganismos creció en el medio de cultivo carente de nitrógeno combinado. Ocho cepas solubilizaron fosfato de calcio, tres fosfatos de hierro y una solubilizó potasio, destacándose las cepas T10 y T12 de *Azotobacter* y T16 de *Bacillus* por solubilizar más de un nutriente (Tabla 4).

La capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y solubilizar fosfatos de cepas de los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum* se demostró también en los estudios de Pérez-Pazos & Sánchez (2017). Por su parte, el potencial para la solubilización de fosfatos y la FBN de *Bacillus* ha sido descrito en otras investigaciones como la de Zahid et al. (2015) y existen incluso referencias de estas características para cepas asociadas a gramíneas como el maíz (*Zea mays* L.) (Rojas et al., 2016).

Las cepas de bacterias aisladas desde trigo también mostraron actividad antagonista. En la Fig. 1 se

observan los resultados de los ensayos que se realizaron con tres especies de *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. chlamyosporum*, *F. oxysporum*) y *C. lunata*.

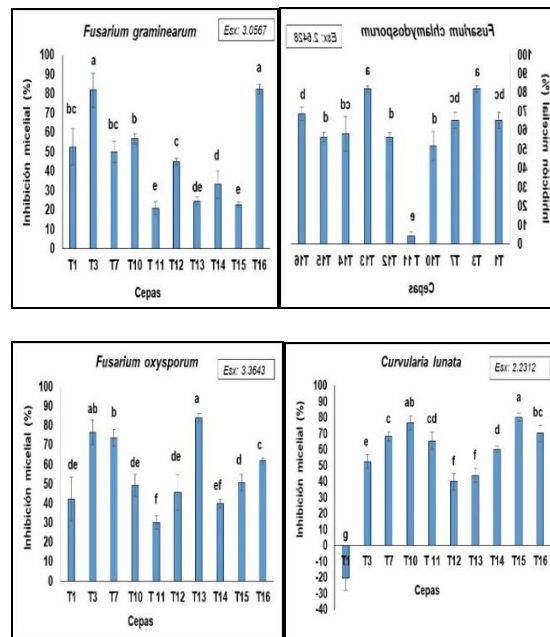
**Tabla 2. Características morfológicas de los microorganismos seleccionados, aislados desde los cultivares Cuba C 204 e I 399 de trigo (*Triticum aestivum* L.)**

Cepa	Micromorfología	Forma	Bordes	Elevación	Consistencia	Color
T1	Bacilo corto Gram negativo	Irregular	Enteros	Ligeramente levantada	Seca	Blanca
T3	Bacilo corto Gram negativo	Irregular	Enteros	Plana	Seca	Blanca
T7	Bacilo corto Gram negativo	Circular	Enteros	Convexa	Mucosa	Beige
T10	Bacilo corto Gram negativo	Circular	Enteros	Convexa	Mucosa	Traslúcida
T 11	Bacilo Gram negativo	Circular	Enteros	Convexa	Mucosa	Traslúcida
T12	Bacilo corto Gram negativo	Circular	Enteros	Convexa	Mucosa	Beige
T13	Bacilo largo, en cadena Gram positivo	Irregular	Irregulares	Ligeramente levantada	Seca con gránulos	Blanca
T14	Bacilo Gram positivo con espora	Circular	Enteros	Convexa	Mucosa	Beige
T15	Bacilo Gram positivo con espora	Irregular	Enteros	Ligeramente levantada	Seca	Amarilla-blanca
T16	Bacilo Gram positivo con espora	Irregular	Enteros	Ligeramente levantada	Seca con gránulos	Blanca

**Tabla 3. Características fisiológicas y categorización propuesta de los microorganismos seleccionados, aislados desde los cultivares Cuba C 204 e I 399 de trigo (*Triticum aestivum* L.)**

Cepa	Fisiología										Categorización propuesta
	Ox	Cat	Mot	Gel	Alm	Cas	Klig	Cit	RM		
T1	+	+	+	-	-	-	+	+	+		<i>Azospirillum</i>
T3	+	+	+	-	+	-	-	-	+		<i>Azospirillum</i>
T7	+	+	+	-	-	-	-	-	-		<i>Azotobacter</i>
T10	+	+	+	-	-	-	+	+	+		<i>Azotobacter</i>
T 11	+	+	+	-	-	-	-	+	-		<i>Azotobacter</i>
T12	+	+	+	-	-	-	-	+	+		<i>Azotobacter</i>
T13	+	+	+	-	+	+	+	-	+		<i>Bacillus</i>
T14	+	+	+	-	+	-	-	-	+		<i>Bacillus</i>
T15	+	+	+	-	-	-	+	-	+		<i>Bacillus</i>
T16	+	+	+	-	-	+	-	-	-		<i>Bacillus</i>

**Nota:** Ox: prueba de la oxidasa, Cat: prueba de la catalasa, Mot: motilidad, Gel: hidrólisis de gelatina, Alm: hidrólisis de almidón, Cas: hidrólisis de caseína, Klig: crecimiento modificando a coloración amarilla el medio de cultivo Agar Kligler, Cit: uso de citrato como fuente de carbono, RM: prueba de Rojo Metilo



**Fig. 1.** Actividad antagonista de los microorganismos seleccionados aislados desde los cultivares Cuba C 204 e I 399 de trigo (*Triticum aestivum* L.) ante cuatro especies fitopatógenas

**Nota:** Medias en la misma columna con letras distintas difieren estadísticamente p (0,05). n=10

**Tabla 4. Mecanismos directos de estimulación del crecimiento vegetal evaluados para las cepas seleccionadas aislados desde los cultivares Cuba C 204 e I 399 de trigo (*Triticum aestivum* L.)**

Cepa	Crecimiento en el medio de cultivo		Solubilización (Halo cm)			
	Ashby sin nitrógeno	Calcio	Hierro	Aluminio	Potasio	
T1	+	-	-	-	-	
T3	+	0,08	-	-	-	
T7	+	0,12	-	-	-	
T10	+	-	0,1	-	0,1	
T 11	+	0,16	-	-	-	
T12	+	0,09	0,1	-	-	
T13	+	0,08	-	-	-	
T14	+	0,18	-	-	-	
T15	+	0,17	-	-	-	
T16	+	0,10	0,1	-	-	

Ante *F. graminearum* las 10 cepas presentaron porcentajes de inhibición micelial superior al 20%, aunque se deben destacar las cepas T3 (*Azospirillum*) y T16 (*Bacillus*) por sus resultados positivos, con un porcentaje superior al 80%. *F. chlamyosporum* fue también afectado por todas las bacterias, las que inhibieron en alguna medida el crecimiento del hongo; aunque se destacaron nuevamente los géneros *Azospirillum* y *Bacillus* por su efectividad, representados en el primer caso por la misma cepa T3 y en el segundo, por la cepa T13. Estas dos cepas bacterianas sobresalieron también por su actividad antagonista ante *F. oxysporum*, aunque la cepa T7 de *Azotobacter* mostró también resultados relevantes. Sin embargo, ante *C. lunata* no se destacaron ninguno de los microorganismos anteriormente mencionados. En este caso, las cepas T15 de *Bacillus* y T10 de *Azotobacter* fueron las que alcanzaron los mayores porcentajes de control (76,7 y 80,1%, respectivamente).

La cepa T11 de *Azotobacter* fue el microorganismo con menor efecto antagonista ante las tres especies de *Fusarium*, a pesar de que se había destacado por sus características como fijador de nitrógeno y solubilizador de fosfato de calcio. Otro resultado interesante del estudio fue el que aportó la cepa T1 de *Azospirillum*, la que estimuló el crecimiento de *C. lunata*, de ahí que el porcentaje de inhibición micelial fue negativo. Un aspecto que llamó la atención es que del mismo género bacteriano hay cepas que presentan actividad antagonista ante una especie fitopatógena y otras que no, lo cual demuestra la especificidad de esta interacción bacteria-hongo, ya que el efecto no se garantiza por el género en sí, sino por la cepa. Resultado similar obtuvo Rojas et al. (2017), donde a pesar de que la mayor parte de las cepas de *Bacillus* que utilizó mostraron un porcentaje de inhibición micelial ante *F. oxysporum* superior al 80%, otras no presentaron actividad o controlaron el crecimiento fúngico solamente entre un 20 y 40%.

Las investigaciones de Ruiz-Sánchez et al. (2016) demostraron que especies de *Bacillus*, particularmente *B. subtilis* inhibían el crecimiento de *C. lunata* entre un 59-78 %, en dependencia de la cepa. Rojas et al. (2017), por su parte, comprobaron que diferentes cepas de este género bacteriano tienen actividad ante *F. oxysporum* y *F. moniliforme*, con un porcentaje de inhibición micelial para la mayor parte de las cepas superior al 80 %. *B. subtilis*, en el estudio de Mahmoud (2016), limitó de forma significativa el crecimiento de *F. graminearum*. También existen referencias del potencial antagonista de *Bacillus* ante *C. lunata* con porcentajes de inhibición micelial entre 20 y 70%, en dependencia de la especie (Toledo-Hernández et al., 2021). Estos resultados son similares a los que mostraron algunas de las cepas de *Bacillus* en la presente investigación, por lo que esta corrobora el potencial antagonista de este grupo bacteriano.

Dentro de los mecanismos que contribuyen al control biológico del género *Bacillus* se incluyen la producción de sustancias antimicrobianas como bacterocinas, surfactinas, iturinas y fegicina (esta última con efecto sobre *Fusarium*), la competencia y la colonización, donde intervienen aspectos como la formación de biopelículas y la producción de sideróforos, así como la producción de enzimas líticas como quitinasas, proteasas y glucanasas y compuestos volátiles como aldehídos y cetoínas (Villarreal-Delgado et al., 2017; Cesa-Luna et al., 2020; Pedraza et al., 2020). Cualquiera de estos mecanismos o su combinación pudo provocar la respuesta de las cepas de *Bacillus* ante los patógenos en estudio.

Aunque los géneros *Azospirillum* y *Azotobacter* son más conocidos por sus características como fijadores de nitrógeno y productores de fitohormonas (Pérez-Pazos & Sánchez, 2017; Vega-Celedón et al., 2016), también se ha demostrado en otras investigaciones su potencial antagonista. J. J. Hernández et al. (2015) comprobaron que cepas de *Azospirillum* tenían acción

antagonista ante *Fusarium* sp y *Sclerotium* sp, en tanto para *Azotobacter*, se demostró la capacidad de producir sideróforos como aminochelin, azotochelin, protochelin y azotobactin con efecto ante patógenos como *F. oxysporum*.

La inoculación de las cepas bacterianas en los cultivares Cuba C 204 e I 399 de trigo demostró la posibilidad de incrementar el valor de indicadores del crecimiento con la aplicación de microorganismos, aunque la respuesta de la planta dependió del cultivar. El número de hojas y el diámetro del tallo no respondieron a la inoculación, al no presentar diferencias significativas entre los tratamientos Testigo e inoculados, al igual que la masa fresca de las plantas para el cultivar I 399 (Tablas 5 y 6).

En el cultivar I 399 las cepas T11 y T14 estimularon la altura de la planta y el largo de la raíz, respectivamente, en tanto la masa seca de la planta se incrementó con la aplicación además de las cepas T3, T10 y T13. Sin embargo, sobre el cultivar Cuba C 204 el efecto de la aplicación de los microorganismos fue más marcado ya que se destacaron más cepas. En este caso, los indicadores con mayor respuesta a la aplicación fueron la altura y la masa fresca de la planta, ambos influenciados por la presencia en la interacción planta-microorganismo de cinco de los siete microorganismos utilizados (T3, T7, T10, T11 y T13 para la altura de la planta y T1, T3, T7, T11 y T12 para la masa fresca de las plantas). Se destacaron en este cultivar las cepas T3, T7 y T11 que estimularon ambos indicadores y en particular la T11, cuya aplicación aumentó también la longitud de la raíz y la masa seca de la planta.

En los ensayos se comprobó que la cepa aislada de un cultivar no es necesariamente efectiva como estimulador del crecimiento en este material vegetal. Por ejemplo, la cepa T14, que se destacó en el cultivar I 399, es un *Bacillus* endófito aislado previamente del cultivar Cuba C 204, en tanto la cepa T3, que incrementó indicadores del crecimiento en el cultivar Cuba C 204, es un *Azospirillum* aislado de tallos del cultivar I 399.

La presencia de mecanismos de estimulación del crecimiento en *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Bacillus* se discutió anteriormente. En cuanto a la efectividad de estos géneros en interacción con el cultivo del trigo, Alves et al. (2017) demostraron que la inoculación de esta especie vegetal con *Azospirillum* incrementa el peso de las plantas, tal y como sucedió para la cepa T3 y el cultivar Cuba C 204. En otros estudios, la aplicación de compost y micorrizas combinados con *Azotobacter* y *Bacillus*, respectivamente, también incrementó el rendimiento del trigo en campo (Andrade et al., 2021). Estas referencias incrementan el valor práctico de los resultados alcanzados, ya que las cepas más efectivas en interacción con las plantas, podrían mantener este efecto estimulador del crecimiento también en condiciones de producción.

**Tabla 5. Indicadores del crecimiento en plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) cultivar I 399, con y sin la aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal**

Tratamiento	Altura de la planta (cm)	Largo de la raíz (cm)	Número de hojas	Diámetro del tallo (mm)	Masa fresca (g)	Masa seca (g)
T1	32,83 b	3,77 cd	3	0,2	0,91	0,02 e
T3	34,39 ab	3,5 d	3	0,2	1	0,03 abc
T7	35,0 ab	4,03 bcd	3	0,2	1	0,02 bcde
T10	34,82 ab	4,05 bc	3	0,2	0,99	0,04 a
T11	36,1 a	4,16 bc	3	0,2	0,99	0,03 ab
T12	34,42 ab	3,81 cd	3	0,2	0,96	0,03 abcd
T13	34,49 ab	4,54 ab	3	0,2	0,96	0,03 ab
T14	32,86 b	4,76 a	3	0,2	1	0,04 a
T15	33,87 ab	4,51 ab	3	0,2	0,98	0,02 cde
T16	34,01 ab	4,03 bcd	3	0,2	0,98	0,03 abcd
TESTIGO	33,49 ab	4,17 bc	3	0,2	0,95	0,02 de
Exx	1,1358	0,201	0,0000 ns	0,000 ns	0,0452 ns	0,0034

**Nota:** Medias en la misma columna con letras distintas difieren estadísticamente p (0,05). n=30

**Tabla 6. Indicadores del crecimiento en plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) cultivar Cuba C 204, con y sin la aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal**

Tratamiento	Altura de la planta (cm)	Longitud de la raíz (cm)	Número de hojas	Diámetro del tallo (mm)	Masa fresca (g)	Masa seca (g)
T1	33,47 cd	3,15 f	3	0,2	1,25 a	0,02 d
T3	36,74 a	4,17 def	3	0,2	1,14 ab	0,03 abc
T7	36,06 ab	3,79 ef	3	0,2	1,11 ab	0,03 abcd
T10	35,55 bc	4,59 bcde	3	0,2	1,08 bc	0,02 d
T11	35,58 bc	5,65 ab	3	0,2	1,11 ab	0,04 a
T12	34,23 abcd	4,61 bcde	3	0,20	1,09 b	0,02 bcd
T13	34,72 abc	5,04 bcd	3	0,2	1,04 bc	0,02 cd
T14	33,59 bcd	6,49 a	3	0,2	1,02 bc	0,03 abcd
T15	32,91 cd	5,58 abc	3	0,20	0,98 bc	0,03 ab
T16	33,8 bcd	5,37 bc	3	0,2	1,01 bc	0,02 abcd
TESTIGO	31,37 d	4,50 cde	3	0,2	0,93 c	0,02 bcd
Exx	1,0371	0,3934	0,0000 ns	0,000 ns	0,0542	0,0042

**Nota:** Medias en la misma columna con letras distintas difieren estadísticamente p (0,05). n=30

## Conclusiones

Asociados a las plantas de trigo existe una diversidad microbiana donde se incluyen representantes de los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Bacillus* con potencial para fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar nutrientes y con actividad antagonista ante *Fusarium graminearum*, *Fusarium chlamydosporum*, *Fusarium oxysporum* y *Curvularia lunata*. Algunas de estas cepas tienen además efecto estimulador del crecimiento en interacción con los cultivares de trigo Cuba C 204 e I 399, por lo que son promisorias para la obtención de un nuevo bioproducto de uso agrícola que estimule el rendimiento de esta especie vegetal bajo las condiciones de Cuba.

## Contribución de los autores

Yoania Ríos Rocafull: planeación de la investigación, diseño, toma de datos, análisis, interpretación y redacción del artículo.

Marisel Ortega García: análisis de resultados, diseño y revisión final.

Janet Rodríguez Sánchez: búsqueda de literatura, análisis de resultados, revisión final.

Bernardo Dibut Álvarez: análisis de los resultados.

## Conflictos de interés

No se declaran.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al proyecto Mejora del comportamiento de maíz (*Zea mays* L.), sorgo (*Sorghum sp.*) y trigo (*Triticum aestivum* L.) mediante su asociación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (P131LH001.08), del Programa Nacional Producción de Alimentos y su Agroindustria, por el soporte financiero para realizar la investigación.

## Referencias

- Alves, C.J., Arf, O., Ramos, A.F., Galindo, F.S., Nogueira, L.M., & Rodrigues, R.A.F. (2017). Irrigated wheat subjected to inoculation with *Azospirillum brasilense* and nitrogen doses as top-dressing. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 21 (8), 537-542. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v21n8p537-542>
- Andrade, F. C., Fernandes, F., Oliveira, A., Rondina, A.B.L., Hungria, M., & Nogueira, M.A. (2021). Enrichment of organic compost with beneficial microorganisms and yield performance of corn and wheat. *Brazilian Journal of Agricultural and Environmental Engineering*, 25 (5), 332-339. <http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v25n5p332-339>
- Baldani, I., Massena Reis, V., Videira, S., & Boddey, L. H. (2014). The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant Soil*, 384, 413–431 (2014). <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2186-6>
- Brenner, D.J., Krieg, N.R., & Stanley, J. T. (Eds.) (2005). Volume 2: The Proteobacteria. Part B. The Gammaproteobacteria. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (pp. 384-402). Springer US.
- Cavalcante, V.A., & Dobereiner, J. (1988). A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil*, 108, 23–31. <https://doi.org/10.1007/BF02370096>
- Cesa-Luna, C., Baez, A., Quintero-Hernández, V., de La Cruz, J., Castañeda-Antonio, M. D., & Muñoz-Rojas, J. (2020). Importancia de compuestos antimicrobianos producidos por bacterias benéficas en el biocontrol de fitopatógenos. *Acta Biológica Colombiana*,

- 25(1), 140-154.  
<http://dx.doi.org/10.15446/abc.v25n1.76867>
- Chinakwe, E.C., Ibekwe, V.I., Nwogwugwu, U.N., Onyemekara, N.N., Ofoegbu, J., Mike-Anosike, E., Emeakaraoha, M., Adeleye, S., & Chinakwe P.O. (2019). Microbial population changes in the rhizosphere of tomato *Solanum lycopersicum* varieties during early growth in greenhouse. *Malaysian Journal of Sustainable Agriculture (MJSA)*, 3(1), 23-27.  
<http://doi.org/10.26480/mjsa.01.2019.23.27>
- de la Fé, Y., Díaz de la Osa, A., Restrepo, G. M., Diván- Baldani V. L., & Hernández, A. (2015). Diversidad de bacterias diazotróficas asociativas potencialmente eficientes en cultivos de importancia económica. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 4(1), 17-26.  
<http://www.rccb.uh.cu/index.php/RCCB/artic le/view/85>
- Departamento de Suelos y Fertilizantes. (2018). *Manual Práctico para el Uso de Bioproductos*. Órgano Central del Ministerio de la Agricultura.
- Grobelak, A., Napora, A., & Kacprzak, M. (2014). The impact of plant growth promoting bacteria (PGPB) on the development of phytopathogenic fungi. *Folia Biologica et Oecologica*, 10, 107-112.  
<http://doi.org/10.2478/fobio-2014-0008>
- González, H., & Fuentes, N. (2017). Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal. *Revista de Ciencias Agrarias*, 34(1), 17-31.  
<http://dx.doi.org/10.22267/rcia.173401.60>
- Harrigan, W.F., & Mc Cance, M. (1968). *Métodos de Laboratorio en Microbiología*. Ed. Academia.
- Hernández, A., Pérez, J.M., Bosch, D. & Castro, N. (2015). *Clasificación de los suelos de Cuba*. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Instituto de Suelos. Ediciones INCA.
- Hernández, J. J., Morales, P.G., Rodríguez, R.F., & Sánchez, J.M. (2015). Inoculación de *Burkholderia cepacia* y *Gluconacetobacter diazotrophicus* sobre la fenología y biomasa de *Triticum aestivum* var. Nana F2007 a 50% de fertilizante nitrogenado. *Scientia Agropecuaria*, 6(1), 7-16.  
<https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.0 1.01>
- Hernández, J.L., Cubillos, J.G., & Milian, P.E. (2012). Aislamiento de cepas de *Rhizobium spp.*, asociados a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe. *Revista Colombiana de Microbiología Tropical*, 2(2), 51-62.  
[https://www.researchgate.net/publication/298 069900\\_Aislamiento\\_de\\_cepas\\_de\\_Rhizobiu m\\_spp\\_asociados\\_a\\_dos\\_leguminosas\\_forraj eras\\_en\\_el\\_Centro\\_Biotecnologico\\_del\\_Cari](https://www.researchgate.net/publication/298 069900_Aislamiento_de_cepas_de_Rhizobiu m_spp_asociados_a_dos_leguminosas_forraj eras_en_el_Centro_Biotecnologico_del_Cari)
- [be Isolation of Rhizobium spp associated two forage leguminous in the Caribbean Biotech](http://dx.doi.org/10.15446/abc.v25n1.76867)
- Madigan, M.T., Bender, K.S., Buckley, D.H., Sattley, W. M., & Sthal, D.A. (2018). *Brock Biology of Microorganisms*. (15th edition). Published by Pearson.
- Mahmoud, A.F. (2016). Genetic variation and biological control of *Fusarium graminearum* isolated from wheat in Assiut-Egypt. *Plant Pathology Journal*, 32(2),145-156.  
<https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.09.2015.020 1>
- Martínez, V. R., López, M., Brossard, F. M., Tejada, G. G., Pereira, A. H., Parra, Z. C., Rodríguez, S. J., & Alba, A. (2006). *Procedimientos para el estudio y fabricación de Biofertilizantes Bacterianos*. Ed. INIA.
- Martínez, S., Gómez-Kosky, R., Rodríguez, G., Veitia, N., Saucedo, O., & Gil, V. (2016). Caracterización morfoagronómica de plantas de sorgo granifero variedad CIAP 132R-5 regeneradas vía embriogénesis somática en condiciones de campo. *Centro Agrícola*, 43(3), 73-79.  
[http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V4 3-Numero\\_3/cag09316.pdf](http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V4 3-Numero_3/cag09316.pdf)
- Pedraza, L. A., López, C. E., & Uribe-Vélez, D. (2020). Mecanismos de acción de *Bacillus spp.* (Bacillaceae) contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con planta. *Acta Biológica Colombiana*, 25(1), 112-125.  
<http://dx.doi.org/10.15446/abc.v25n1.75045>
- Pérez-Pazos, J.V., & Sánchez, D.B. (2017). Caracterización y efecto de *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* asociadas a *Ipomoea Batatas* del Caribe Colombiano. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(2), 35-46.  
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v1 9n2.69471>
- Piña, J., García, V., Herrera, H., & Flores, J. A. (2016). Valoración de cepas silvestres de *Azospirillum sp.* y *Gluconacetobacter sp.* como promotoras de crecimiento vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(7), 1613-1623.  
<http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v7n7/ 2007-0934-remexca-7-07-1613.pdf>
- Rojas, M. M., Sánchez, D., Rosales, K., & Lugo, D. (2017). Antagonismo de *Bacillus* frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas. *Revista de Protección Vegetal*, 32(2), 1-9.  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010- 27522017000200005&script=sci\\_arttext&tl n g=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010- 27522017000200005&script=sci_arttext&tl n g=pt)
- Rojas, M. M., Tejera, B., Bosh, D.M., Ríos, Y., Rodríguez, J., & Heydrich, M. (2016). Potentialities of *Bacillus* strains for promoting growth in maize (*Zea mays* L.)



- Cuban Journal of Agricultural Science*, 50(3), 485-496. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2079-34802016000300016](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2079-34802016000300016)
- Ruiz-Sánchez, E., Mejía-Bautista, M.Á., Serrato-Díaz-Serrato, A., Reyes-Ramírez, A., Estrada-Girón, Y., & Valencia-Botín, A.J. (2016). Actividad antifúngica e identificación molecular de cepas nativas de *Bacillus subtilis*. *Agrociencia*, 50, 133-148. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v50n2/1405-3195-agro-50-02-00133.pdf>
- Saldaña, J.M. (2017). Aislamiento e identificación de cepas nativas de *Rhizobium phaseoli* de Suelo de la Presa de la Juventud de Marín, Nuevo León. *Revista Iberoamericana de Producción Académica y Gestión Educativa*, 4(7). <https://www.pag.org.mx/index.php/PAG/articulo/view/659/826>
- Toledo-Hernández, E., Peña-Chora, G., Toribio-Jiménez, J., Romero-Ramírez, Y., Bolaños-Dircio, A., Velázquez-del Valle, M. G., Hernández-Lauzardo, A.N., León-Rodríguez, R., & Vero, S. (2021). Isolated rhizobacteria of *Jatropha curcas* L.: antagonistic activity of phytopathogens and plant growth promoter. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 27(2), 181-198. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2020.04.029>
- Vega-Celedón, P., Canchignia, H., González, M., & Seeger, M. (2016). Biosíntesis de ácido indol 3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*, 37 (N° especial), 33-37. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.1.5158.3609>
- Villarreal-Delgado, M.F., Villa-Rodríguez, E.D., Cira-Chávez, L.A., Estrada-Alvarado, M.I., Parra-Cota, F.I., & de los Santos-Villalobos, S. (2017). The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(1), 95-130. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>
- Vital, L., Cruz, M.A., Fernández, S., & Mendoza, A. (2015). Diversidad bacteriana en raíces de maíz híbrido convencional y genéticamente modificado. *PHYTON. Revista Internacional de Botánica Experimental*, 84, 233-243. <http://www.scielo.org.ar/pdf/phyton/v84n1/v84n1a30.pdf>
- Yadav, A. N. (2017). Agriculturally Important Micro biomes: Biodiversity and Multifarious PGP Attributes for Amelioration of Diverse Abiotic Stresses in Crops for Sustainable Agriculture. *Biomedical Journal of Scientific and Technical Research*, 1(4), 1- 4. <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2017.01.000321>
- Zahid, M., Kaleem, M., Hameed, S., & Rahim, N. (2015). Isolation and identification of indigenous plant growth promoting rhizobacteria from Himalayan region of Kashmir and their effect on improving growth and nutrient contents of maize (*Zea mays* L.). *Front. Microbiol.*, 6, 207, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00207>