

Evaluación del crecimiento y desarrollo de agave (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck) y calabaza criolla (*Cucurbita pepo* L.) inoculada con *Methylobacterium radiotolerans*

Evaluation of the growth and development of agave (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck) and creole pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) inoculated with *Methylobacterium radiotolerans*

Luis Fernando Gómez Hinojosa¹

¹Alumno de la Licenciatura en Ingeniería en Agronomía

lf.gomezhinojosa@ugto.mx¹

Quiahuitl María Guadalupe Zavala Navarro²

²Estudiante de Doctorado en Biociencias

qmn.zavalanavarro@ugto.mx²

Manuel Darío Salas Araiza³

³Profesor del Departamento de Agronomía, Universidad de Guanajuato

salas@ugto.mx³

Rafael Guzmán Mendoza³

³Profesor del Departamento de Agronomía, Universidad de Guanajuato

rafael.guzman@ugto.mx³

Resumen

La calabaza criolla (*Cucurbita pepo*) es uno de los vegetales más cultivados en los sistemas de producción más antiguos y tradicionales, además de que el agave (*Agave salmiana*) es una de las plantas más representativas de México y que se encuentra en peligro de extinción, por su parte la calabaza aporta de carbohidratos y vitaminas en la dieta de las personas y el agave es mayormente utilizado para la fabricación de destilados. La escasa investigación y desarrollo de nuevas tecnologías han limitado la optimización de la producción del cultivo de calabaza y la baja reproducción de muchas especies de agave. En el presente trabajo se evaluó la bacteria *Methylobacterium radiotolerans* en el crecimiento de calabaza y sobrevivencia ex vitro de plántulas de agave. Los tratamientos evaluados fueron la inoculación de semillas de calabaza y plántulas de agave con *M. radiotolerans* a una concentración de 1×10^7 UFC·mL⁻¹ en comparación con un tratamiento testigo. Los resultados nos arrojaron que la bacteria *M. radiotolerans* no presentó mejoras estadísticamente en el crecimiento de calabaza y adaptación al trasplante de plántulas de agave, sin embargo los resultados tendían a mejorar con la aplicación de la misma bacteria. Aunque estadísticamente los resultados fueron muy parecidos, el trabajo abre una ventana de investigación más a fondo en un futuro.

Palabras clave: Microorganismos; In vitro, cultivos criollos, agaves.

Introducción

La calabaza criolla (*Cucurbita pepo*), es uno de los vegetales más cultivados en los sistemas de producción tradicionales del mundo y en especial de Mesoamérica, sin embargo, no hay la suficiente tecnología que ayude a optimizar la producción y la rentabilidad de este cultivo (Rössel *et al.*, 2018).

En México según se produjeron 4,732 toneladas de calabaza criolla con un rendimiento promedio de 12.3 toneladas por hectárea sembrada (SIAP, 2024).

La demanda de calabaza ha ido en aumento debido al alto contenido de carbohidratos y vitaminas que aporta, además de que sus semillas tienen altos niveles de aceite y proteínas, por lo que nos vemos en la necesidad de buscar técnicas que nos ayuden a elevar la calidad y el rendimiento en dicho cultivo (Rössel *et al.*, 2018).

En México, el cultivo de agave también es de gran de gran importancia cultural y económica. Existen más de 200 especies de *Agave*, la mayoría endémicas, constituye el sustento de miles de familias rurales mexicanas y es ampliamente utilizados para la producción de alimentos, bebidas, fibras, forrajes y biocombustibles, posicionando a México como el segundo mayor productor de *Agave* a nivel mundial. El *Agave*, con su

metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), exhiben una alta adaptabilidad a condiciones áridas y tolerancia a estrés hídrico, sin embargo algunas especies de agave se encuentran en peligro de extinción ocasionado por la sobreexplotación, por lo cual es fundamental encontrar alternativas para su preservación como las técnicas de propagación *in vitro*, el cual depende de sus porcentajes de supervivencia a su adaptación *ex vitro*.

Algunas bacterias pueden generar simbiosis con las plantas como lo son las bacterias del género *Methylobacterium* que pueden llegar a fijar nitrógeno atmosférico y contribuir al perfil de la ureasa dentro de la planta (Holland, 1997).

Methylobacterium symbioticum es una bacteria que se ha demostrado puede alterar el metabolismo de las plantas, llegando a reducir las fertilizaciones nitrogenadas en un 50% en el caso del maíz y un 25% en fresa (Torres-Vera *et al.* 2024). Un ejemplo de esto es la especie *M. symbioticum*, que incluso ya se venden productos a base de esta bacteria que ayudan a generar mayor biomasa y por consiguiente mayor producción en cultivos de importancia económica. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la bacteria *Methylobacterium radiotolerans* sobre las características morfológicas de calabaza criolla en cuanto a su germinación, desarrollo de plántula y producción de biomasa, así como su efecto sobre la aclimatación *ex vitro* de *Agave salmiana* en cuanto a supervivencia.

Materiales y métodos

Material vegetal.

Se trabajó con 60 semillas de calabaza criolla, donadas por un productor de la comunidad de Las Liebres, Romita, Guanajuato (20°50'07"N 101°28'08"O), con una altitud de 1,747 msnm. De acuerdo con el productor es una variedad criolla sembrada en la localidad desde hace ya varios años.

Además, se trabajó con 60 plántulas de *A. salmiana in vitro* del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Guanajuato, en Irapuato, Guanajuato (20°44'31"N 101°19'54"O), con una altitud de 1,748 msnm. La planta madre de las plántulas se encuentra en la Colección Nacional de Agaves, de la Universidad de Guanajuato.

Método de inoculación de *Methylobacterium radiotolerans*.

Todo el material se esterilizó en autoclave a 15 PSI y 120°C por 40 minutos y todo este proceso se realizó en condiciones de estériles en una campana de extracción de flujo laminar (Jain *et al.*, 2020).

Para el crecimiento de *M. radiotolerans* se utilizó medio Murashige y Skoog (MS) adicionado con metanol (0.5% v/v), dado que el género es conocido por su capacidad de crecer en medios con metanol como fuente de carbono (Madhaiyan *et al.*, 2007) y se incubó a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante nueve días.

Como se recomienda en manuales de microbiología (Cappuccino y Welsh, 2019), se hicieron diluciones seriadas de 1 ml de muestra de bacterias al décimo (1:10) con agua destilada estéril 1, 1:10, 1:100, 1:1,000 y 1:10,000. Posteriormente se añadió a cada una de las diluciones 90 µL de azul de metileno para observar las células en el microscopio, posteriormente se procedió a contar el número de células por mililitro con una cámara de Neubauer (Figura 1). Una vez hecho esto se preparó la solución de inoculación a una dosis de $1 \times 10^7 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Para la inoculación de las semillas de calabaza se realizó un primero una desinfección para lo cual se sumergieron en etanol (70% v/v) durante 2 minutos, luego en una solución de hipoclorito de sodio comercial (20% v/v) durante 10 minutos y por último se realizaron cuatro enjuagues con agua destilada estéril, tal como se hace en distintos estudios para desinfectar semillas (Aguilar-Jiménez & Rodríguez de la O, 2020). Posteriormente las semillas de calabaza se sumergieron en la solución inoculante de $1 \times 10^7 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ durante 15 minutos y agua destilada como testigo, por último, se procedió a sembrarlas en charolas de poliestireno con 60 cavidades, se utilizó el sustrato Peat moss Sunshine mezcla No. 3 y perlita (3:1 v/v) (Figura 1). Las plántulas se mantuvieron en los cuartos de crecimiento durante 5 semanas a una temperatura de 25 °C y con un fotoperiodo de 16 h luz con 8 h de oscuridad para evaluar la germinación y desarrollo de las plántulas.



Figura 1. Proceso de inoculación de bacteria *M. radiotolerans* en semillas de calabaza criolla.

Diseño experimental.

Para la *C. pepo*: Se realizaron 2 tratamientos (inoculación con *M. radiotolerans* y testigo sin inocular) con 30 repeticiones, y cada planta se consideró una unidad experimental, el primer tratamiento consistió en la inoculación de semillas de calabaza con *M. radiotolerans* en una concentración de 1×10^7 UFC·mL⁻¹ durante 15 minutos, el control se utilizaron semillas sin inocular. tratadas únicamente con agua destilada estéril.

Aclimatación ex vitro de *A. salmiana*: Las plantas de *A. salmiana in vitro* se propagaron en medio MS sólido, adicionado con sacarosa (30 g·L⁻¹), y agar (8 g·L⁻¹). Se trasplantaron las plántulas después de 3 meses de crecimiento *in vitro* a sustrato de espuma fenólica, los dos tratamientos evaluados fueron la inoculación de 30 plántulas con la bacteria *M. radiotolerans* a una concentración de 1×10^7 UFC·mL⁻¹ durante 15 minutos y 30 con el tratamiento testigo donde se sumergieron las plántulas en agua destilada estéril durante 15 minutos, posteriormente las plántulas se mantuvieron en los cuartos de crecimiento durante dos semanas a una temperatura de 25 °C y con un fotoperiodo de 16 h luz con 8 h de oscuridad.

Resultados

Germinación

Se obtuvo un porcentaje de germinación estadísticamente igual en los dos tratamientos evaluados $100\% \pm 0$ con la inoculación de *M. radiotolerans* y $96.6\% \pm 5.8$ en las semillas testigo (Figura 2).

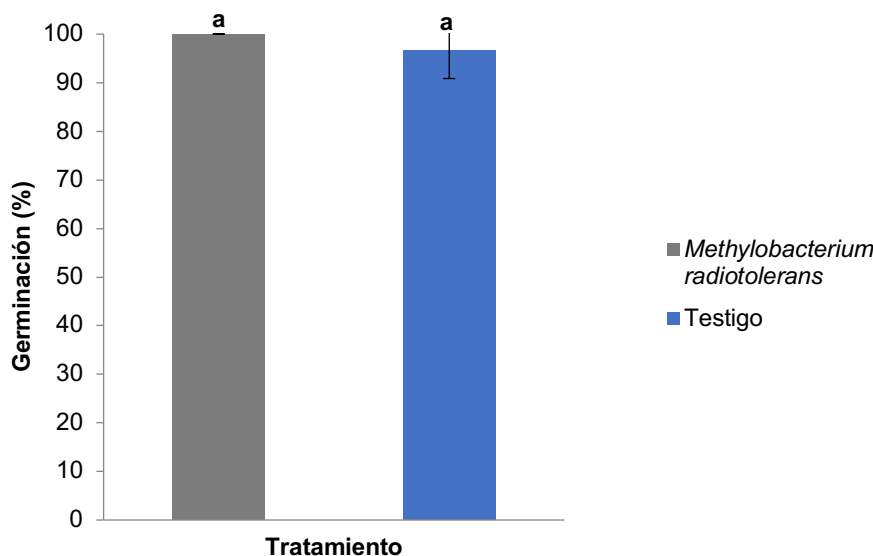


Figura 2. Efecto de *M. radiotolerans* sobre la germinación de semillas de *C. pepo*. Las letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Tukey $p < 0.05$).

Cuantificación del peso seco de las hojas.

En cuanto al peso seco en gramos de la parte foliar de las plántulas se observó un mayor peso seco en las plantas inoculadas con *M. radiotolerans* con 0.78 ± 0.09 g en comparación al tratamiento testigo con 0.71 ± 0.09 g, sin embargo, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los dos tratamientos evaluados que fueron inoculación. Esto puede deberse al periodo tan corto de evaluación sin embargo sí existió una tendencia al incremento en la producción de biomasa por parte del tratamiento con *M. radiotolerans*, lo que podría ayudar en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Figura 3).

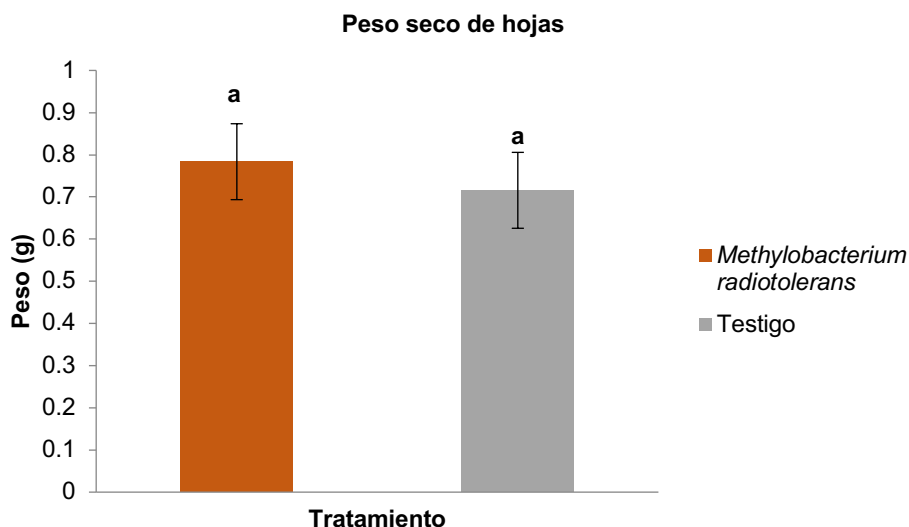


Figura 3. Efecto de *M. radiotolerans* sobre el peso seco de las hojas de *C. pepo*. Las letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Tukey $p < 0.05$).

Cuantificación del peso seco de la raíz.

Por su parte el peso seco de la raíz tampoco mostro diferencias significativas con respecto a los dos tratamientos evaluados que fueron inoculación con *M. radiotolerans* 0.065 ± 0.02 y el tratamiento testigo 0.058 ± 0.01 (Figura 4).

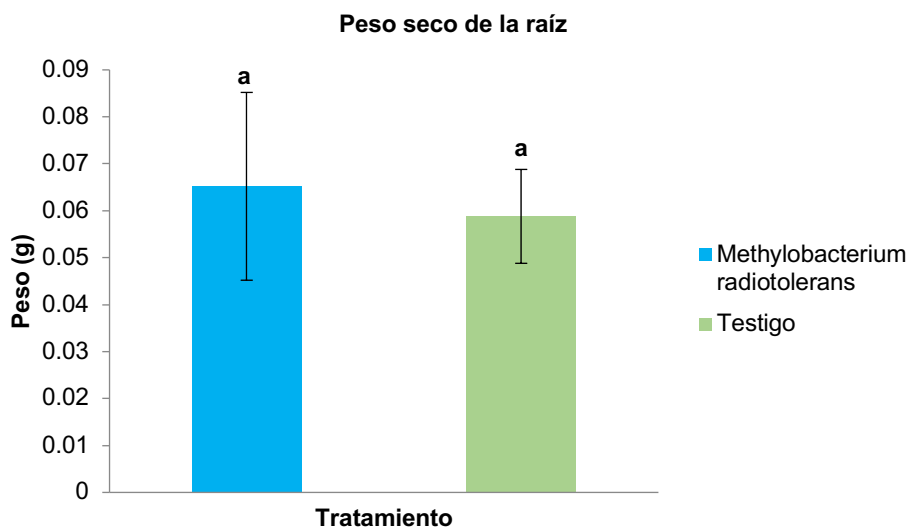


Figura 4. Efecto de *M. radiotolerans* sobre el peso seco de la raíz de plantas de *C. pepo*. Las letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Tukey $p < 0.05$).

Supervivencia de plántulas *Agave salmiana* por aclimatación *ex vitro*.

Por su parte se evaluó el efecto de *M. radiotolerans* sobre el porcentaje de supervivencia de plántulas de *A. salmiana* propagadas *in vitro*, las cuales se sometieron a un proceso de aclimatación, trasplantándolas a espuma fenólica. En este estudio se observó el mismo porcentaje de supervivencia tanto con *M. radiotolerans* como con el tratamiento testigo se obtuvo $100\% \pm 0$, por lo que no existió diferencia significativa (Figura 5). Sin embargo, cabe destacar que las plántulas inoculadas con *M. radiotolerans* visualmente se observaron más desarrolladas y mejor adaptadas al sustrato que el tratamiento testigo (Figura 6).

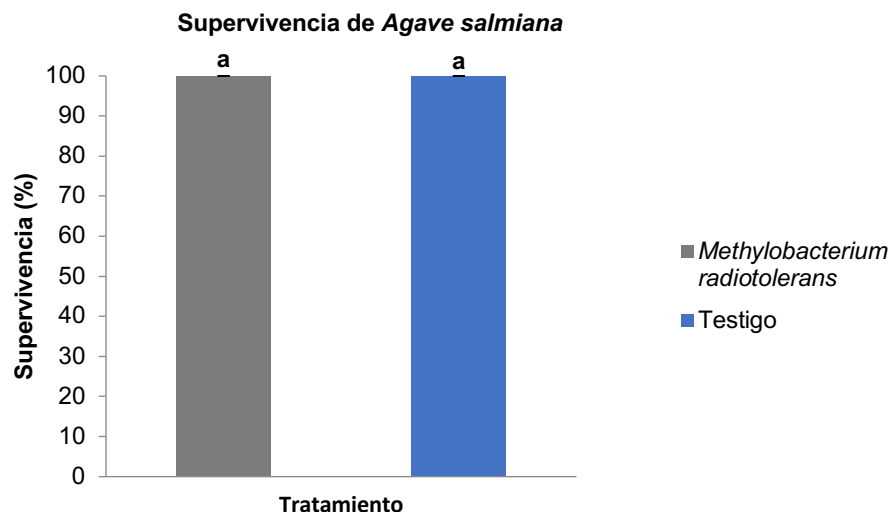


Figura 5. Efecto de *M. radiotolerans* sobre el porcentaje de supervivencia en plántulas de *A. salmiana* en aclimatación *ex vitro*. Las letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Tukey $p < 0.05$).



Figura 6. Aclimatación de plantas *ex vitro* de *A. salmiana*.

Discusión

En este estudio se observó una tendencia a generar una mayor biomasa tanto en las raíces como en las hojas de la calabaza criolla con la inoculación de *M. radiotolerans*. Aunque los resultados no son significativos, la calabaza al ser una variedad tradicionalmente cultivada en sistemas de policultivo, su respuesta podría estar relacionada con una mayor eficiencia en la absorción de nutrientes y una modulación hormonal inducida por la rizobacteria. En *A. salmiana* visualmente se observó una mejor adaptación de las plántulas también inoculadas con *M. radiotolerans*, como lo reportado por Arrobas *et al.* 2024 y Rodríguez *et al.* 2024, la mejor adaptación visual tras el trasplante podría indicar una interacción simbiótica temprana que favorece la resiliencia al estrés por manipulación, como lo han sugerido estudios previos con *M. symbioticum* en especies xerófitas. Esta respuesta diferencial, aunque no significativa en las variables cuantificadas, abre la posibilidad de explorar marcadores fisiológicos más sensibles o condiciones de estrés controlado para evaluar el potencial bioestimulante de *M. radiotolerans* en cultivos nativos y estratégicos para la soberanía alimentaria y conservación genética. En el caso de la Calabaza Criolla, también los resultados abren una ventana de posibilidades para influir significativamente en cultivos que son trabajados en un contexto de agroecosistemas, agricultura familiar y agroecología.

Conclusión

El efecto de *Methylobacterium* como bacteria benefica para la germinación y desarrollo de plantas no mostro resultados significativos. No obstante, el potencial de investigación a nivel de agroecosistemas, agroecología y biología evolutiva puede resultar ser una herramienta útil para la optimización de recursos en la producción de alimentos en el sector agrícola.

Bibliografía/Referencias

- Aguilar-Jiménez, D., & Rodríguez de la O, J.L. (2020). Efecto de nitrato de plata en la germinación *in vitro* de *Euphorbia nutans* Lag. *Biotecnología Vegetal*, 4: 338-350
- Arrobas, M., Correia, C. M., & Rodríguez, M. Á. (2024). *Methylobacterium symbioticum* applied as a foliar inoculant was little effective in enhancing nitrogen fixation and lettuce dry matter yield. *Sustainability*, 16(11), 4512.
- Cappuccino, J.G., & Welsh, C. (2019). *Microbiology: a laboratory manual*. Twelfth edition. New York. Pearson,
- Holland, M. A. (1997). *Methylobacterium* and plants. *Recent Research Development in Plant Physiology*, 1, 207-213.
- Jain, A., Jain, R., & Jain, S. (2020). Autoclave. In: *Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology*. Springer Protocols Handbooks. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9861-6_4
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., & Tongmin, S. (2007) Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Chemosfera*, 69(2): 220-228. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.04.017>
- Rodríguez, M. Á., Correia, C. M., & Arrobas, M. (2024). The application of a foliar spray containing *Methylobacterium symbioticum* had a limited effect on crop yield and nitrogen recovery in field and pot-grown maize. *Plants*, 13(20), 2909.
- Rössel K., D., Ortiz L., H., Amante O., A., Durán G., H. M., & López M., L. A. (2018). Características físicas y químicas de la semilla de calabaza para mecanización y procesamiento. *Nova scientia*, 10(21), 61-77.
- SIAP (2024). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Gob.mx. Recuperado el 21 de julio de 2025, de https://nube.agricultura.gob.mx/cierre_agricola/
- Torres-Vera, R., Bernabé García, A. J., Carmona Álvarez, F. J., Martínez Ruiz, J., & Fernández Martín, F. (2024). Application and effectiveness of *Methylobacterium symbioticum* as a biological inoculant in maize and strawberry crops. *Folia microbiologica*, 69(1), 121-131.