



ARTÍCULO ORIGINAL

Caracterización de bacterias diazotróficas asociativas con actividad promotora del crecimiento vegetal en *Oryza sativa* L.

Characterization of associative diazotrophic bacteria with plant growth promoting activity in Oryza sativa L.

Annia Hernández-Rodríguez¹, Narovis Rives-Rodríguez¹, Acela Díaz-de la Osa¹,
Yeised de la Fe-Pérez¹, Gema Pijeira-Fernández¹ y Vera Lucia Divan-Baldani²

¹ Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba

² Laboratorio de Gramíneas. EMBRAPA Agrobiología. Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

* Autor para correspondencia:
annia@fbio.uh.cu

RESUMEN

Oryza sativa L. es una gramínea de alto valor nutritivo y elevado consumo a nivel mundial. En Cuba, las producciones del cultivo no dan respuesta a su alta demanda, por lo que el desarrollo de estrategias dirigidas hacia el aumento de su rendimiento constituye una prioridad para la agricultura. Este trabajo tiene como objetivo caracterizar bacterias diazotróficas asociativas con actividad promotora del crecimiento vegetal en *O. sativa*. Los aislados bacterianos y las cepas controles estudiadas fijan nitrógeno atmosférico, producen fitohormonas y solubilizan fósforo inorgánico. Se demuestra que la inoculación bacteriana favorece el desarrollo del sistema radical y de la parte aérea de las plantas, con un mayor incremento en el cultivar LP5, lo que podría estar relacionado con una mayor especificidad planta-bacteria. Asimismo, la contribución relativa derivada de la FBN está en el rango del 12 al 33 % en las plantas del cultivar LP5 y del 10 al 30% en las de Perla de Cuba. El análisis de las secuencias del gen que codifica para el ARNr 16S permitió la identificación de las especies bacterianas *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas putida* y *Enterobacter sacchari*. Estos resultados tienen aplicación e importancia práctica en el diseño de estrategias ecológicamente sustentables en *Oryza sativa*.

Palabras clave: AIA; fijación de nitrógeno; solubilización de fosfatos; ¹⁵N

ABSTRACT

Oryza sativa L is a grass of high nutritional value and high consumption worldwide. In Cuba, crop production does not respond to high demand, so the development of strategies aimed at increasing its yield is a priority for agriculture. This work aims to characterize associative diazotrophic bacteria with plant growth promoting activity in *O. sativa*. The bacterial isolates and control strains studied fix atmospheric nitrogen, produce phytohormones

Recibido: 2016-10-29

Aceptado: 2016-12-18

and solubilize inorganic phosphorus. It is demonstrated that the bacterial inoculation favors the development of the root system and the aerial part of the *O. sativa* plants, with a greater increase in the LP5 cultivar which could be related to a greater plant-bacterial specificity. Likewise, the relative contribution derived from BNF is in the range of 12 to 33% in plants of cultivar LP5 and 10 to 30% in Perla de Cuba. Analysis of the sequences of the gene encoding the 16S rRNA allowed the identification of the bacterial species *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas putida* and *Enterobacter sacchari*. These results have application and practical importance in the design of ecologically sustainable strategies in *O. sativa*.

Keywords: IIA, nitrogen fixation, phosphate solubilization, ^{15}N .

INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.) es un cereal imprescindible para la alimentación de dos tercios de la población mundial. Su producción promedio anual alcanza, aproximadamente, 745 710 miles de toneladas (FAO, 2014). En Cuba, el arroz constituye un componente fundamental en la dieta diaria de la población aportando el 20 % de las calorías que se consumen, con un consumo per cápita considerado entre los más altos de América Latina (Porrata-Maury, 2009), no obstante, la producción del cultivo no completa la demanda del mercado nacional.

El nitrógeno es un elemento limitante para la productividad vegetal. La planta de *O. sativa* demanda nitrógeno desde las fases iniciales de su ciclo de vida hasta el inicio de la maduración y la fertilización nitrogenada en el cultivo se realiza de forma fraccionada para favorecer mayor eficiencia en la nutrición. Diversos autores han demostrado que las dosis de nitrógeno y el momento de aplicación, influyen en la ocurrencia y severidad de la piriculariosis o añublo del arroz, causado por *Pyricularia oryzae* (Sacc.) (Pinciroli et al., 2006; Hernández-Rodríguez et al., 2013).

Las bacterias diazotróficas asociativas con capacidad para promover el crecimiento de las plantas, representan una fuente potencial a utilizar, con el objetivo de elaborar productos eficientes que pudieran ser utilizados en beneficio de *O. sativa*. Se ubican en diferentes géneros como *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Glucanacetobacter*, *Azoarcus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Citrobacter* y *Serratia* (Pedraza et al., 2010; Baldani et al., 2014, Reed et al., 2015). Estas bacterias, además del aporte de nitrógeno que hacen a través de la Fijación Biológica (FBN), pueden promover el crecimiento de las plantas mediante otros mecanismos de acción. Estos efectos incluyen la solubilización de minerales (Estrada et al., 2013; Restrepo-Franco et al. 2015) y la síntesis de

fitohormonas (Pedraza et al., 2010). También se ha observado su influencia en la absorción de elementos minerales, debido a incrementos en los flujos iónicos de la superficie de las raíces (Hernández-Rodríguez et al., 2010) y su efecto en el control de patógenos fúngicos (Hernández-Rodríguez et al., 2013, Reed et al., 2015). Sin embargo, para lograr un producto eficiente, se deben seleccionar cepas autóctonas de cada localidad edafoclimática y esclarecer los verdaderos mecanismos a través de los cuales ejercen su acción.

Este trabajo tiene como objetivos caracterizar bacterias diazotróficas asociativas con actividad promotora del crecimiento vegetal en *Oryza sativa* L.cv.LP5 y Perla de Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen, pureza y multiplicación de aislados bacterianos

Se utilizaron los aislados autóctonos cubanos FN1, FN2, FN3, FN6, *Pseudomonas putida* AJ13 y *Pseudomonas fluorescens* AI05, previamente aislados de *O. sativa*, y las cepas patrones *Azospirillum brasilense* SP7 (aislada de raíz de *Digitaria decumbens* Stent.), *Azospirillum brasilense* 245 (aislada de raíz de *Triticum aestivum* L.) y *Herbaspirillum seropedicae* Z94 (aislada de raíz de *O. sativa*) procedentes de la Colección de Cultivos de EMBRAPA Agrobiología.

Las bacterias se sembraron en medio de cultivo líquido DYGS (Rodríguez et al., 1986) y luego se pasaron a medio de cultivo LB (Luria Bertani) sólido para la verificación de la pureza. De las placas de LB sólido se tomaron colonias aisladas y se resembraron en los medios de cultivo semisólidos NFb (Dobereiner et al., 1976), JNFb (Baldani et al., 1992) y JMV (Baldani, 1996), según correspondiera. Una vez reactivadas y verificada la pureza de los cultivos bacterianos, se mantuvieron en medio Medio Basal con Sacarosa

(BMS) (Baldani *et al.*, 2014) sólido para la realización de los experimentos propuestos.

Fijación biológica del nitrógeno

Se empleó el Ensayo de Reducción del Acetileno (ARA, según sus siglas en inglés) descrito por Boddey *et al.* (1987). Se inocularon 10 µL de los aislados en medio semisólido semiespecífico, a partir de cultivos previamente crecidos en medio DYGS líquido (24 horas a 30°C). Los frascos se incubaron a 30°C por 48 horas y cuando la película de crecimiento se manifestó, se cerraron con tapones de goma estériles y con una jeringuilla se inyectó 1 mL del gas acetileno. Se incubaron durante 1 hora a 30°C. Posteriormente, 0,5 mL de la fase gaseosa se inyectó en el cromatógrafo de gases con ionización de llama, marca Perkin Elmer modelo F11. Se utilizó una columna Poropak N de 50 cm, a 40°C y realizó la lectura de etileno producido por la reducción del acetileno. Se incubaron los frascos durante 1 hora a 30°C. Posteriormente, 0,5 mL de la fase gaseosa se inyectó en el cromatógrafo de gases con ionización de llama, marca Perkin Elmer modelo F11.

Producción de compuestos indólicos

Este ensayo se realizó según la metodología descrita por Gordon y Weber (1950) modificada por Rodríguez (2002). Una colonia característica de cada microorganismo se cultivó en medio DYGS líquido en condiciones de agitación a 150 rpm por 24 horas a 30°C. Posteriormente, 1 µL del cultivo bacteriano se inoculó en 20 mL de medio DYGS suplementado con L-triptófano a una concentración final de 200 µg mL⁻¹. Los tubos se mantuvieron en la oscuridad y en agitación a 150 rpm a una temperatura de 30°C por un período de 24 a 48 horas. Después de este período se centrifugaron a 1000 rpm durante 15 min. Luego se tomaron alícuotas de 150 µL del sobrenadante, se mezclaron con 100 µL del reactivo de Salkowski y se incubaron en la oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se realizaron las lecturas en espectrofotómetro con longitud de onda de 540 nm. La concentración de auxinas del tipo AIA se calculó mediante el empleo de una curva patrón realizada con concentraciones conocidas de AIA (10-100 µg/mL).

Solubilización de fosfato tricálcico

Se empleó el medio de cultivo NBRIP (Nautiyal, 1999) con fosfato inorgánico en forma de fosfato tricálcico Ca₃(PO₄)₂. Una colonia característica de cada aislado se cultivó en medio DYGS en agitación a 150 rpm y

30°C por un período de 24 horas. Posteriormente se inocularon 20 µL de cada cultivo en el medio NBRIP y las placas se incubaron por 5 días. Los halos de solubilización se midieron y se empleó como criterio de comparación el índice de solubilización (Kumar y Narula, 1999), según la fórmula: IS=A/B, Donde: A= Diámetro total (Diámetro de la colonia + diámetro del halo) y B= Diámetro da colonia.

Bioensayos de interacción planta-bacteria con los aislados seleccionados

Se realizaron dos bioensayos para determinar el efecto de los aislados en diferentes parámetros del crecimiento de plántulas de *O. sativa* y en la FBN. Para el montaje de los experimentos, las semillas de *O. sativa* se descascararon y desinfectaron siguiendo la metodología descrita por Baldani *et al.* (1996). Luego se colocaron en placas de petri con agar agua (10 g/L) para pregerminar durante 2 días. Se emplearon los cultivares cubanos LP5 y Perla de Cuba. Se utilizaron los aislados seleccionados y las cepas patrones *A. brasilense* SP7, *A. brasilense* 245 y *H. seropedicae* Z94.

Montaje del bioensayo en tubos de cultivo: Las semillas previamente desinfectadas y pregerminadas se colocaron en tubos de cultivo con capacidad de 120 mL, inoculados con 50 mL de Solución de Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950) con 6 g/L de agar y las suspensiones bacterianas de cada uno de los aislados. Las suspensiones bacterianas se inocularon justo antes de la solidificación del agar, entre 40-45°C de temperatura. Los tubos se mantuvieron en condiciones ambientales durante 21 días y al cabo de este período se determinaron los parámetros del crecimiento de las plantas altura, longitud de la raíz más larga, peso fresco aéreo y de raíz, y peso seco aéreo y de raíz.

En el segundo bioensayo se adicionó 50 mg de Sulfato de Amonio con 1.634 de ¹⁵N en exceso/L a la Solución de Hoagland y se determinó el peso seco total, nitrógeno acumulado, % de átomos de ¹⁵N en exceso y FBN (%Nitrógeno derivado de la atmósfera), donde % Nitrógeno derivado de la atmósfera= [1-(% átomos ¹⁵N en exceso de plantas inoculadas / %átomos ¹⁵N en exceso de plantas no inoculadas)].

Identificación de los aislados promisorios

El DNA genómico se extrajo de las células bacterianas cultivadas en medio DYGS durante 24 horas. Para ello se utilizó el Kit QIamp DNA[®] (QIAGEN[®]) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La cuantificación y

verificación de la calidad de la extracción se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% de acuerdo a la metodología descrita por Sambrook y Russell (2001). La amplificación del fragmento se realizó empleando los cebadores 27f (5'AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) (Furushita *et al.*, 2003) y Amp2 (5'AAG GAG GTG ATC CAR CCG CA) (Wang *et al.*, 1993). La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 μL compuesto por una mezcla de reacción con concentraciones de 200 μM de dNTP, 1 μM de cada cebador, 2 mM de MgCl_2 y 0,02 unidades. μL^{-1} de enzima Taq polimerasa. La amplificación se desarrolló en un termociclador (Biometra TGradient) programado para un ciclo de 3 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C y 2 min a 72°C, y un ciclo de elongación final de 5 min a 72°C. Los productos de PCR se secuenciaron en el Servicio de secuenciación de EM-BRAPA Agrobiología, Rio de Janeiro, Brasil.

Análisis biométricos

De forma preliminar, a todas las variables se les realizó la prueba de normalidad y la homogeneidad de varianza. Se realizaron análisis de varianza de clasificación simple y las medias se compararon a través de la prueba de Tukey. Se utilizó una repetición representativa de cada experimento en las figuras. Todos los análisis fueron realizados utilizando el software STATISTICA 8.0 (Stat Soft, Inc., Tulsa, OK, USA).

RESULTADOS

Caracterización fisiológica de los aislados

Los resultados muestran que los aislados bacterianos y las cepas controles estudiadas fijan nitrógeno atmosférico, producen fitohormonas y solubilizan fós-

foro inorgánico (Tabla 1). Los mayores valores de μmol de C_2H_2 por mg de proteína total correspondieron a *Azospirillum brasilense* Sp245 y Sp7, seguidos por los aislados FN6 y FN3 con valores de 124 y 104 μmol de C_2H_2 por mg de proteína total, respectivamente. En cuanto a la producción de compuestos indólicos, los valores oscilaron entre 5,7 y 65 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, destacándose los aislados FN2 y FN3 con las mayores producciones de este compuesto, similares al control positivo. De modo general, los aislados, excepto FN1, mostraron capacidad de solubilizar fosfato tricálcico, lo que se revela por la formación de halos transparentes alrededor de las colonias bacterianas. Los índices de solubilización estuvieron en un rango de 1,27 y 2,70.

Ensayo de interacción planta-bacteria en dos cultivares de *O. sativa*

En las figuras 1 y 2 se muestra el efecto de la inoculación bacteriana sobre el crecimiento de plantas de 21 días de edad. Se observan incrementos en la altura y la longitud de la raíz en los distintos tratamientos inoculados con las bacterias con relación al control para $p \leq 0.05$ (Figura 1). Los tratamientos correspondientes a plantas inoculados con *Azospirillum brasilense* 245 y Sp7, y *H. seropedicae* Z94, empleadas como controles positivos, produjeron incrementos en estos parámetros.

Con relación a la masa fresca y seca de la parte aérea y de la raíz, se observan notables diferencias en la mayoría de los tratamientos inoculados con respecto al control sin inocular, destacándose los tratamientos donde las plantas fueron inoculadas con FN3, AJ13, FN1 y las cepas patrones. Los mayores incrementos, en

Tabla 1. Caracterización fisiológica de los aislados y cepas controles.

Table 1. Physiological characterization of isolates and control strains.

Aislados y cepas patrones	μmol de C_2H_2 por mg de proteína total	Producción de compuestos indólicos ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)	Índice de solubilización de fosfato
FN1	22	5,7	0
FN2	48	65,0	1,27
FN3	104	63,8	1,81
FN6	124	24,2	2,70
AI05	ND	10,4	2,41
AJ13	ND	12,8	2,14
Sp7	160	ND	ND
Sp245	261	10,15	2,10
Z94	100	12,21	1,94

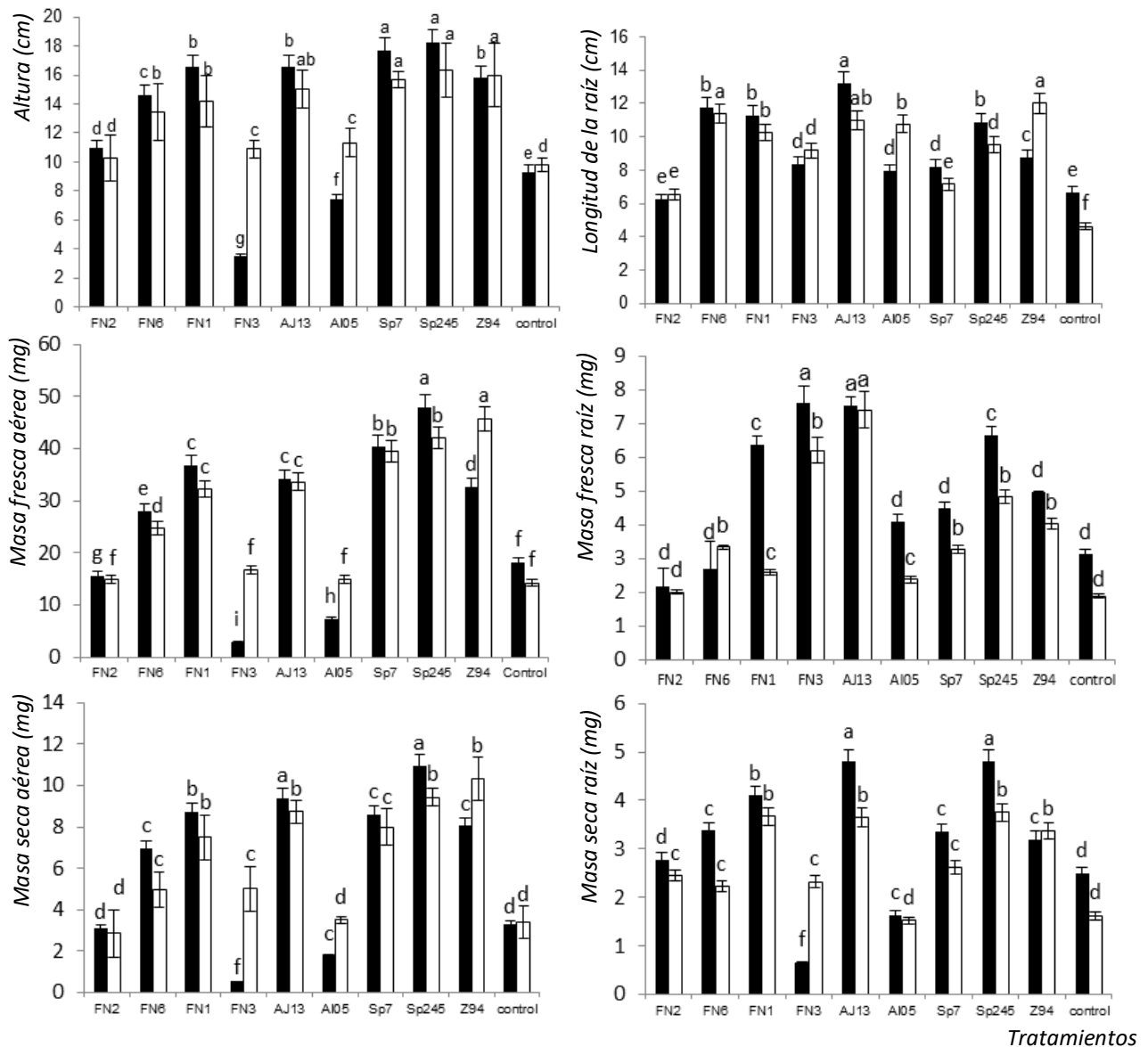


Figura 1. Efecto de las bacterias diazotróficas en la promoción del crecimiento vegetal de *Oryza sativa* L. cv. LP5 (barras negras) y Perla de Cuba (barras blancas). Letras no comunes indican diferencias significativas según prueba Tukey para $p < 0.05$.

Figure 1. Effect of diazotrophic bacteria on the *Oryza sativa* L. growth promotion cv. LP5 (black bars) and Perla de Cuba (white bars). Non-common letters indicate significant differences according to Tukey test for $p < 0.05$.

la mayoría de los parámetros evaluados, se obtuvieron en el cultivar LP5 inoculado con las bacterias con respecto a Perla de Cuba (Fig. 1).

En la Figura 2A se observan incrementos de la parte aérea y de raíz de las plantas inoculadas con *H. seropedicae* Z94 y *P. putida* AJ13 con relación al control sin inocular. *Pseudomonas putida* AJ13 incrementa la cantidad y el tamaño de los pelos radicales y las raíces laterales (Fig. 2B).

Aportes de nitrógeno a la planta a través de la FBN

Se evaluó la contribución de las bacterias seleccionadas al contenido de nitrógeno de las plántulas vía FBN. El contenido total de nitrógeno acumulado varió de $79 \mu\text{g N planta}^{-1}$ en las plantas controles hasta $89\text{--}130 \mu\text{g N planta}^{-1}$ en los tratamientos donde las plantas fueron inoculadas con las bacterias. El mayor valor se obtuvo en las plantas tratadas con *H. seropedicae* Z94 (Tabla 2). La contribución relativa derivada de

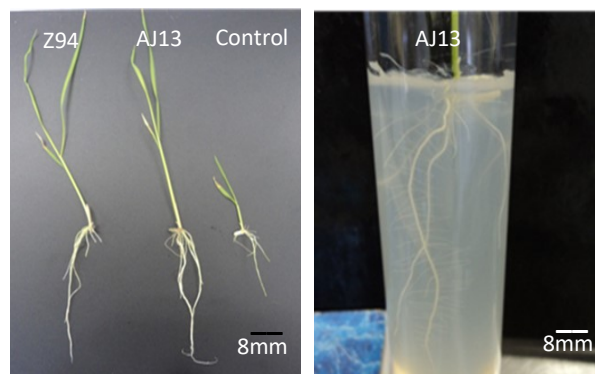


Figure 2. Efecto promotor del crecimiento vegetal de Z94 y AJ13 en *O. sativa* cv. LP5. A. Crecimiento de la planta. B. Estimulación del sistema radical.

Figure 2. Effect of plant growth promoter of Z94 and AJ13 in *O. sativa* cv. LP5. A. Plant growth. B. Radical system stimulation.

la FBN fue de entre 12 y 33 % en las plantas del cultivar LP5 y del 10 al 30% en el cultivar Perla de Cuba.

Identificación de las cepas

A partir del análisis de las secuencias del gen que codifica para el ARNr 16S, se identificaron a los aislados FN1, FN2, FN3 y FN6 como *Pseudomonas* sp.,

Enterobacter sacchari, *Pseudomonas putida* y *Azospirillum brasilense*, respectivamente (Tabla 3). En todos los casos se presentaron porcentajes de similitud nucleotídica del 99%, con relación a secuencias contenidas en bases de datos internacionales (*GenBank*).

DISCUSIÓN

Los resultados muestran la capacidad de *A. brasilense* FN6, *P. putida* FN3, *E. sacchari* FN2, *Pseudomonas* sp. FN1, *P. putida* AI05 y *P. fluorescens* AJ13 de fijar nitrógeno atmosférico, demostrando el potencial que tienen estas bacterias diazotróficas para llevar a cabo la FBN en plantas gramíneas. Estas bacterias también solubilizan fosfatos inorgánicos y producen metabolitos del tipo AIA.

Diversos estudios demuestran que los organismos diazotróficos colonizan sus hospedantes contribuyendo con cantidades sustanciales de nitrógeno fijado biológicamente. Por ejemplo, Kennedy *et al.* (2004) señalaron que algunas especies de *Herbaspirillum* aportaron a la planta de *O. sativa* del 19 % al 54 % del nitrógeno requerido para su crecimiento y desarrollo, en dependencia del cultivar. Asimismo, en cultivos de *Zea mays* L. y de *O. sativa* en condiciones de inundación esta contribución varía de 20 a 50 kg ha⁻¹ de nitrógeno al año (Ferreira, 2008). Este proceso constituye la principal vía

Tabla 2. Efecto de las bacterias seleccionadas en el crecimiento y la fijación biológica del nitrógeno (FBN) en plantas de *O. sativa* cv. LP5 de 21 días de edad.

Table 2. Effect of selected bacteria on growth and biological nitrogen fixation (BNF) in 21-day-old *Oryza sativa* L. cv. LP5 plants

Inóculo	Masa seca (mg.planta ⁻¹)	N Total (µg.planta ⁻¹)	Porcentaje de exceso de ¹⁵ N (por planta)	FBN (%)
FN3	8,9b	89c	22.5	12
FN6	18,4a	95b	18.4	28
Z94	20,8a	130a	17.0	33
Control*	6,4c	79d	25.6	0

*Semillas inoculadas con células esterilizadas a 121°C. PA (parte aérea) R (raíz) %Nda (% de nitrógeno derivado de la atmósfera). Letras no comunes indican diferencias significativas según prueba Tukey para p<0.05.

Tabla 3. Identificación de los aislados mediante amplificación del gen que codifica al ARNr 16 S.

Table 3. Identification of the isolates by amplification of the gene encoding 16S rRNA.

Aislado	Clasificación	Identificación	
		Porcentaje de similitud nucleotídica	No. acceso
FN1	<i>Pseudomonas</i> sp.	99%	KT266904
FN2	<i>Enterobacter sacchari</i>	99%	HQ204281.2
FN3	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	KF278708
FN6	<i>Azospirillum brasilense</i>	99%	FR745918.1

de incorporación del nitrógeno al ecosistema del suelo (Richardson *et al.*, 2009) y se lleva a cabo por la enzima nitrogenasa que requiere la colaboración de otras dos proteínas y un ambiente anoxigénico (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014).

La solubilización de fosfatos orgánicos por los microorganismos es un proceso catalizado por enzimas, a diferencia de lo que ocurre con el fosfato inorgánico, cuya solubilización transcurre fundamentalmente mediante la producción de ácidos orgánicos (Restrepo-Franco *et al.*, 2015). Los microorganismos solubilizadores de fosfatos son considerados como promotores del crecimiento vegetal al aumentar la disponibilidad de fósforo inorgánico en el suelo que puede ser utilizado por las plantas para aumentar su rendimiento (Rodríguez y Fraga, 1999; Restrepo-Franco *et al.*, 2015). Por otro lado, las bacterias diazotróficas poseen, en su mayoría, capacidad de producir fitohormonas, dentro de ellas las auxinas como el ácido indol-3- acético (AIA), son las más comunes. La producción bacteriana de AIA ha sido estudiada no solo por su efecto fisiológico en las plantas, sino también por la función que puede desempeñar esta fitohormona en la interacción planta-microorganismo (Spaepen y Vanderleyden, 2011)

En esta investigación se demostró que la inoculación bacteriana favorece el desarrollo del sistema radical y de la parte aérea de las plantas de *O. sativa*, observándose diferencias significativas de los tratamientos inoculados a los controles en cada uno de los cultivares estudiados. En la mayoría de los parámetros evaluados se obtuvo un mayor incremento en el cultivar LP5 con la inoculación de las cepas empleadas con respecto al cultivar Perla de Cuba, lo que demuestra una mayor especificidad en la interacción planta-bacteria. Persello-Carteaux *et al.* (2003), Hartman *et al.* (2009) y de La Fe *et al.* (2015) demostraron la acción selectiva de los exudados radicales ante los grupos microbianos presentes en la rizosfera, pudiendo manifestarse un efecto diferenciado según la especie vegetal, la cepa o aislado, la edad de la planta y el cultivar.

La estimulación del crecimiento vegetal podría estar relacionado con la producción de metabolitos del tipo AIA por las cepas inoculadas. El AIA induce el crecimiento de las plantas, al aumentar la división celular y la diferenciación de los tejidos, efectos que se ven reflejados en un mayor contenido de biomasa (Lagunas *et al.*, 2001; Santillana *et al.*, 2005). También se ha planteado que el AIA absorbido por las semillas y las

raíces de las plantas podría estimular la actividad de la enzima ACC sintetasa, la cual está involucrada en la síntesis del etileno y bajas concentraciones de etileno promueven el crecimiento de los pelos radicales de las plantas inoculadas y el área superficial de la raíz (Bhattacharyya y Jha, 2012; Cabras-Cendales *et al.*, 2017), lo que trae consigo aumento en la toma de agua y nutrientes por la planta, y con ello el incremento del crecimiento vegetal.

El desarrollo de un inóculo basado en diazótrofos es aún cuestionable, pero se ha informado que alrededor del 20-30% de los incrementos en los rendimientos en campos de arroz son debido a la inoculación con estos microorganismos y pueden compensar los costos del inóculo (Pedraza *et al.*, 2009; García de Salamonea *et al.*, 2012; de Souza *et al.*, 2013), por lo que los resultados de este trabajo tienen aplicación e importancia práctica en el diseño de estrategias ecológicas sostenibles.

LITERATURA CITADA

- Baldani, J.I., V. Massena Reis, S. Sampaio Videira, H. Boddey Lúcia, *et al.* (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
- Baldani, V.L.D. (1996) Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bacteria diazotrófica. Tesis de Doctorado, Universidad Federal Rural de Rio de Janeiro, Brasil.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogeny. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 62: 293–300.
- Bhattacharyya, P.N., D.K. Jha (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1327–1350.
- Boddey R.M. (1987) Methods for quantification of nitrogen fixation associated with graminiae. *Cr Rev Plant Sci.* 6: 209–266
- Cabra-Cendales T, C.A. Rodríguez-González, C.P. Villota-Cuásquer, O.A. Tapasco-Alzate, A. Hernández-Rodríguez (2017) *Bacillus* effect on the germination and growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L). *Acta Biol. Colomb.* 22(1): 37-44.
- de la Fe Pérez, Y., A. Díaz de la Osa, G.M. Restrepo-Franco, V.L. Diván-Baldani, A. Hernández-Rodríguez (2015) Diversidad de bacterias diazotróficas asociativas potencialmente

- eficientes en cultivos de importancia económica. Rev Cub de Ciencias Biológicas. 4 (1): 17-26.
- de Souza, R., A. Beneduzi, A. Ambrosini, P. Beschoren da Costa, *et al.* (2013) The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. Plant Soil. 366: 585-603.
- Döbereiner, J., J.M. Day (1976) Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. En: Newton W.E., Nyman C.J.N. (eds) Proc. 1st Int Symp Nitrogen Fixation Washington: Pullman, Washington State University Press, pp 518–538
- Estrada, G.A., V.L.D. Baldani, D.M. De Oliveira, S. Urquiaga, *et al.* (2013) Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. Plant Soil. 361.
- Ferreira, J. S. (2008) Qualidade de inoculante, inoculação e reinoculação de *Herbaspirillum seropedicae* em duas variedades de arroz irrigado. Tesis de Doctorado en Agronomía-Ciencia del Suelo. Universidad Federal Rural de Rio de Janeiro, Brasil.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2015). FAO Statistical Pocketbook. P. Gennari (Ed.)
- Furushita, M., T. Shiba, T. Maeda, M. Yahata, *et al.* (2003) Similarity of tetracycline resistance genes applied isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. Applied and Environ Microb. 69:5336–5342.
- García de Salamonea, I.E., J.M. Funesa, L.P. Di Salvoa, J.S. Escobar-Ortega, *et al.* (2012) Inoculation of paddy rice with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact of plant genotypes on rhizosphere microbial communities and field crop production. Applied Soil Ecol. 61: 196-204.
- Hartmann, A., M. Schmid, D. van Tuinen, G. Berg (2009) Plant-driven selection of microbes. Plant Soil. 321: 235-257.
- Hernández-Rodríguez, A., M. Heydrich, B. Diallo, M. El Jaziri, O.M. Vandaputte (2010) Cell-free culture medium of *Burkholderia cepacia* improves seed germination and seedling growth in maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*). Plant Growth Regul. 60: 191-197.
- Hernández-Rodríguez, A., N. Rives-Rodríguez, Y. Acebo-Guerrero, A. Díaz-de la Osa, *et al.* (2014) Potencialidades de las bacterias diazotróficas asociativas en la promoción del crecimiento vegetal y el control de *Pyricularia oryzae* (Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Rev Protec. Veg. 29(1): 1-10.
- Hoagland y Arnon (1950) The water-culture method for growing plants without soil. College of Agriculture, Agricultural Experiment Station. Berkeley, California., 32 p.
- Kennedy I.R., A. Choudhury, M.L. Kecskés (2004) Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? Soil Biol. Biochem. 36: 1229–1244.
- Kumar V., N. Narula (1999) Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. Biol Fertil Soils. 28: 301-305.
- Lagunas, J., E. Zavaleta, S. Osada, S. Aranda, *et al.* (2001) *Bacillus firmus* como agente de Control Biológico de *Phytophthora capsici* Leo. en Jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Rev Mex de Fitop. 19(1): 57- 65
- Ministerio de la Agricultura (MINAG). Instructivo Técnico de Arroz. Centro Nacional de Sanidad Vegetal, Instituto de Investigaciones del Arroz. 2006: 50-55.
- Nautiyal C.S. (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiol Lett. 170: 265-70.
- Pedraza, R.O., C.H. Bellone, S. Carrizo de Bellone, P.M. Fernandes Boa Sorte, *et al.* (2009) Azospirillum inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. Europ. J. Soil Biology. 45: 36 – 43.
- Persello-Cartieaux, F., L. Nussaume, C. Robaglia (2003) Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. Plant Cell and Environment. 26(2): 189-199.
- Pincioli M., M.C. Cordo, R. Bezus, A.A. Vidal, M. Delucis (2006) Development of rice blast under two nitrogen availability conditions. Summa Phytopathologica. 32(3):280-282.
- Porrata-Maury, C. (2009) Consumo y preferencias alimentarias de la población cubana con 15 y más años de edad. Rev. Cub. Aliment. Nutr. 19(1): 87-105.
- Reed S.C., X. Yang, P.E. Thornton (2015) Incorporating phosphorus cycling into global modeling efforts: a worthwhile, tractable endeavor. New Phytol. 208:324–329.
- Restrepo-Franco, G.M., S. Marulanda-Moreno, Y. de la Fe-Pérez, A. Díaz-de la Osa, *et al.* (2015) Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 46(1):63-76.
- Richardson, A.E., J.M. Barea, A.M. McNeill, C. Prigent-Combaret (2009) Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. Plant Soil. 321: 305-339.
- Rodrigues Neto, J., V.A. Malavolta Junior, O. Victor (1986) Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri Tipo B. Summa Phytopathol. 12:16

- Rodríguez H., R. Fraga (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv.* 17:319-339.
- Sambrook, J., D.W. Russell (2001) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Santillana N., C. Arellano, D. Zúñiga (2005) Capacidad de *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). *Ecol. apl.* 4 (1-2): 47-51.
- Spaepen, S., J. Vanderleyden (2011) Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*
- Wang, H., M. Qi, A.J. Cutler (1993) A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Res.* 21: 4153-4154.



Editor para correspondencia: Dra. María Elena Márquez Gutiérrez