



## ARTÍCULO ORIGINAL

## Bacterias promotoras del crecimiento vegetal aisladas de clones de ajo conservados *in vitro*

*Plant growth promoting bacteria isolated from garlic material maintained under slow growth conditions*

Yoania Ríos Rocafull \* 

1 Departamento Recursos Genéticos Microbianos y Productos Bioactivos. Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt", Cuba

\*Autora para correspondencia:  
[dpagrobiotec@inifat.co.cu](mailto:dpagrobiotec@inifat.co.cu)

### RESUMEN

El cultivo *in vitro* se ha utilizado para conservar especies vegetales como el ajo (*Allium sativum* L.). En el Banco de Germoplasma del INIFAT se ha observado que accesiones contaminadas con bacterias tienen con mayor frecuencia bulbos más desarrollados. En el presente trabajo se estudiaron bacterias aisladas desde bulbos de ajo. Se purificaron 19 aislados bacterianos procedentes del medio de cultivo y del interior del material vegetal. Seis de ellos mostraron potencial para realizar la fijación biológica de nitrógeno atmosférico según su crecimiento en medios de cultivo semisólidos carentes de este nutriente. Ninguno de estos microorganismos diazotrofos solubilizó potasio ni presentó capacidad celulolítica. Sin embargo, todos solubilizaron fosfatos inorgánicos en el medio de cultivo. Su aplicación sobre semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y rábano (*Raphanus sativus* L.) estimuló la germinación de la semilla y el crecimiento de la plántula. Con esta bacteria promotora del crecimiento vegetal se podrían proyectar nuevas investigaciones para probar su efecto como estimulador del crecimiento de plantas de ajo en cultivo *in vitro* y en condiciones de producción.

**Palabras clave:** microorganismos, propagación vegetativa, biotecnología

### ABSTRACT

*Slow growth conditions have been used for storage vegetables species like garlic (Allium sativum L.). In the Germplasm Bank of INIFAT it has been observed that accessions contaminated with bacteria most often have a vigorous bulblet development. It promoted that bacteria isolates from those garlic bulblets were studied. Nineteen bacterial isolates were purified from culture medium and inside the plant. Six of them showed potential to carry out biological fixation of atmospheric nitrogen because growth in culture medium without this nutrient. None of these diazotroph microorganisms solubilized potassium or presented cellulolytic capacity. Nevertheless, all of them solubilized inorganic phosphates in culture medium. Tomato (Solanum lycopersicum L.) and radish (Raphanus sativus L.) seeds, imbibed this isolates, increased their germination and plantlets growth. It suggests that*

Recibido: 2020-06-10

Aceptado: 2021-04-30

they could produce hormones that promote plant growth. The isolate called, "Garlic 6" had the best response. It was characterized by morphological and physiologic-biochemical parameters. More studies must be developed about this plant growth promoting bacteria (PGPB) to prove its effect improving garlic plant response to in vitro techniques and field conditions.

**Keywords:** microorganisms, vegetative propagation, biotechnology.

## INTRODUCCIÓN

El ajo (*Allium sativum* L.) es una especie vegetal muy apreciada para fines culinarios y medicinales debido a sus contenidos de minerales y vitaminas. Se caracteriza por poseer una reproducción agámica, con una propagación a partir de bulbillos (Parra *et al.*, 2014).

El cultivo *in vitro* es una herramienta biotecnológica que se puede emplear para minimizar las dificultades que presentan los cultivos en su propagación y para la conservación de especies vegetales valiosas. Es una técnica que permite la propagación clonal de las especies, incrementa de forma rápida el número de individuos y posibilita el establecimiento de un banco de germoplasma con plantas libres de enfermedades. En algunas ocasiones, reduce incluso el tiempo de propagación (Idancochea *et al.*, 2018).

En los protocolos para establecer cultivos *in vitro* se utilizan diferentes hormonas como el ácido indol acético (AIA), la bencil-aminopurina (BAP) y el ácido indolbutírico (AIB) (Idancochea *et al.*, 2018). Este tipo de compuestos también pueden ser liberados por algunos microorganismos (Vega *et al.*, 2016). La producción de fitohormonas, de conjunto con la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de nutrientes, la intervención de la síntesis de etileno y la producción de compuestos con actividad antagónica frente a organismos fitopatógenos, son mecanismos de estimulación del crecimiento de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés), que afectan de manera positiva el desarrollo de las plantas (Palacio *et al.*, 2016).

A pesar de la asepsia del cultivo *in vitro*, pueden proliferar, asociados al material vegetal, bacterias endófitas (Bedoya *et al.*, 2016). Esta investigación tiene como objetivo evaluar la actividad promotora del crecimiento vegetal de diferentes aislados bacterianos procedentes de clones de ajo conservados *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento de los microorganismos

Para el aislamiento de los microorganismos se utilizaron 19 clones de ajo conservados en el Banco de Germoplasma del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT), en su sección de Cultivo *in vitro* (Tabla 1).

**Tabla 1.** Clones de ajo del INIFAT utilizados en la investigación  
**Table 1:** INIFAT garlic clones used in the research

No	Codificación
1	8.1
2	8
3	10
4	4
5	7
6	6
7	1
8	14.2
9	15.8
10	15.3
11	18
12	15.7
13	15
14	11
15	26
16	2
17	15.4
18	VCV
19	8

Se tomaron muestras de la plántula y del medio de cultivo circundante a ésta. Para el caso del material vegetal, secciones de aproximadamente 5 mm se embebieron en una solución de hipoclorito de sodio al 10 % durante 10 minutos. Posteriormente se enjuagaron con abundante agua destilada estéril y se maceraron con el empleo de un mortero estéril. La savia extraída se inoculó en el medio de cultivo Agar Nutritivo (BIOCEN, 2013). Una vez que se mostró crecimiento bacteriano se purificaron los aislados, para lo que se empleó el mismo medio de cultivo de aislamiento.

## Selección de los microorganismos por sus características estimuladoras del crecimiento vegetal

### Potencial de fijación biológica de nitrógeno

Los aislados purificados se inocularon tres veces consecutivas en el medio de cultivo Asbhy semisólido carente de nitrógeno (Martínez *et al.*, 2006). Se consideró que el microorganismo fijaba nitrógeno atmosférico (diazótrofo) si mantenía su crecimiento durante todo el ensayo (Pérez *et al.*, 2014).

### Solubilización de nutrientes

Se evaluó la capacidad de solubilizar fosfatos para los microorganismos diazotrofos, tomando como criterio la formación de un halo de solubilización en el medio de cultivo. Se empleó el medio Pikovskaya suplementado con fosfato tricálcico (Martínez *et al.*, 2006). El índice de solubilización (IS) se calculó mediante la fórmula  $IS = \frac{\text{Diámetro de la colonia} + \text{halo de solubilización}}{\text{diámetro de la colonia}}$  (Edi-Premono *et al.* 1996).

### Producción de sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal

Se evaluó de forma indirecta, a partir del efecto de los microorganismos sobre la germinación de la semilla y el crecimiento de plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (variedad T 60) y de rábano (*Raphanus sativus* L.) (variedad INIFAT C-88). Para el ensayo se emplearon placas Petri de 150 mm de diámetro esterilizadas en autoclave con un disco de papel de filtro en su interior. El papel de filtro se humedeció con agua destilada estéril antes de colocar las semillas. Se utilizaron 50 semillas por placa y cuatro placas por cada tratamiento.

Las semillas se embebieron, durante 10 minutos en una suspensión celular en agua destilada estéril de los aislados bacterianos con una concentración de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> de cada uno de ellos. El tratamiento testigo consistió en la incorporación de agua destilada estéril. Como control positivo en el ensayo se utilizaron tres cepas de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal conservadas en la Colección de Bacterias Beneficiosas del INIFAT, pertenecientes a las especies *Azotobacter chroococcum* (cepa INIFAT-12), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (cepa INIFAT Gd-42) y *Bacillus megatherium* (cepa INIFAT Bm III).

Las semillas se mantuvieron en estas condiciones por períodos de 5 días para el rábano y 10 días para el

tomate. La germinación de la semilla de rábano se evaluó a los dos, tres y cuatro días posteriores a la aplicación de los cultivos microbianos. En el caso del tomate las evaluaciones se extendieron hasta los cinco y siete días. Al finalizar el período de estudio, se midió la longitud de la radícula (cm) y la longitud del hipocótilo (cm), utilizando un pie de Rey con un margen de error de 0,05 mm.

Con los datos obtenidos se calcularon los siguientes indicadores:

- Porcentaje de germinación  $G\% = \frac{(\text{No de semillas germinadas} \times 100)}{\text{total de semillas utilizadas}}$  (Gholami *et al.*, 2009).

- Índice de vigor IV = (Longitud de radícula + longitud de hipocótilo) X % germinación (Gholami *et al.*, 2009).

- Índice de germinación  $GI = \frac{\sum(Gt/Tt)}{Gt}$  (Gt: número de semillas germinadas en el día t. Tt: tiempo desde el inicio del experimento) (Moeinzadeh *et al.*, 2010).

- Velocidad de germinación  $GR = \frac{\sum Ni}{\sum Ti Ni}$  (Ni: número de nuevas semillas germinadas en el tiempo Ti) (Moeinzadeh *et al.*, 2010).

En el experimento se utilizó un diseño Completamente Aleatorizado. Los datos se procesaron estadísticamente comparándose las diferencias entre las medias. Se empleó una prueba de Rangos Múltiples de Duncan con un 5 % de error, previa comprobación de la normalidad de los datos y la homogeneidad de las varianzas según las pruebas de Kolmogorov-Smirnov, Cochran C, Hartley y Bartlett. Se empleó para ello el programa STATGRAPHICS Plus versión 5.0.

### Caracterización morfológica y fisiológica-bioquímica del aislado seleccionado por su potencial estimulador del crecimiento vegetal

Entre los microorganismos que favorecieron el crecimiento vegetal se seleccionó el de mayor efecto, el que se caracterizó mediante indicadores morfológicos y fisiológico-bioquímicos. Lo anterior se realizó a partir de la descripción cultural de las colonias, la micro-morfología (tinción de Gram), la determinación de la presencia de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa, la utilización del citrato como fuente de carbono, la hidrólisis de proteínas (almidón, gelatina), el uso de la glucosa mediante la prueba del medio Kligler, así como la producción de indol a partir del triptófano y la prueba de Rojo de Metilo. Se utilizaron las referencias descritas por Harrigan y Mc Cance (1968).

## RESULTADOS

A partir de los clones de ajo mantenidos bajo condiciones de cultivo *in vitro* se purificaron 19 aislados bacterianos, de ellos el 10,5% procedentes del bulbo interior; el 5,2% procedentes de la raíz interior; el 5,2% de la raíz macerada; el 5,2% del bulbo macerado y el 73,7% procedente del medio de cultivo (Tabla 2).

**Tabla 2.** Microorganismos aislados a partir de clones de ajos mantenidos bajo condiciones de cultivo *in vitro*

**Table 2:** *Microorganisms isolated from garlic clones maintained under in vitro culture conditions*

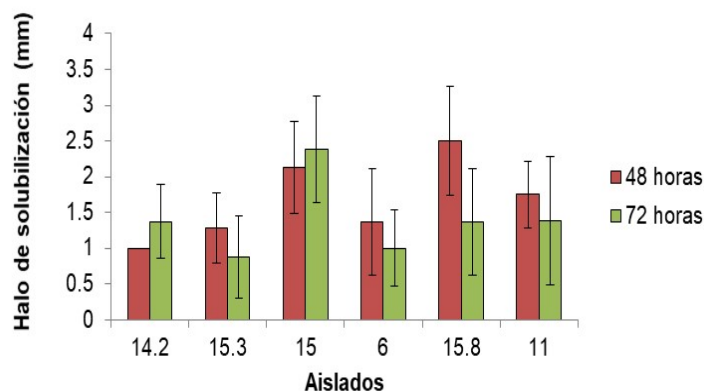
Código del microorganismo	Procedencia
8.1	Bulbo interior
8	Bulbo interior
10	Raíz interior
4	Raíz macerada
6	Bulbo macerado
7	Medio de cultivo
1	Medio de cultivo
14.2	Medio de cultivo
15.8	Medio de cultivo
15.3	Medio de cultivo
18	Medio de cultivo
15.7	Medio de cultivo
15	Medio de cultivo
11	Medio de cultivo
26	Medio de cultivo
2	Medio de cultivo
15.4	Medio de cultivo
VCV	Medio de cultivo
8	Medio de cultivo

De los 19 microorganismos purificados, solo el 31% mostró resultados positivos para la fijación biológica de nitrógeno atmosférico (FBN) (Tabla 3). Todos los microorganismos diazotófos aislados mostraron una respuesta positiva en cuanto a solubilización de fosfatos en el medio de cultivo (Fig. 1). Sin embargo, estos resultados son preliminares, se deben realizar otros experimentos para corroborar esta hipótesis.

**Tabla 3.** Capacidad FBN por parte de los microorganismos aislados de clones de ajo conservados en condiciones de cultivo *in vitro*

**Table 3:** *FBN capacity by microorganisms isolated from garlic clones preserved under in vitro culture conditions.*

Código del microorganismo	Crecimiento durante tres inoculaciones consecutivas
8.1	-
8	-
10	-
4	-
6	+
7	-
1	-
14.2	+
15.8	+
15.3	+
18	-
15.7	-
15	+
11	+
26	-
2	-
15.4	-
VCV	-
8	-



**Figura 1.** Solubilización de fosfatos por parte de bacterias diazotófas aisladas en interacción con clones de ajo mantenidos bajo condiciones de cultivo *in vitro*

**Figure 1.** *Phosphate solubilization by isolated diazotrophic bacteria in interaction with garlic clones maintained under in vitro culture conditions*

Numerosos autores complementan los resultados de medio sólido con ensayos en medio líquido para corroborar la capacidad de las bacterias en cuanto a la solubilización de diferentes fuentes de P (Bashan *et al.*, 2013; Almenares-Casanova *et al.*, 2020).

Al aplicar estos microorganismos que presentaron características de promoción del crecimiento vegetal sobre semillas de tomate y rábano se obtuvieron diferentes efectos en los índices de germinación. Para el caso del tomate se destacaron los aislados codificados como 15.3, 15 y 6. Para el rábano sobresalen los aislados 14.2, 15.3 y 6 (Tabla 4).

**Tabla 4.** Efecto de microorganismos aislados en interacción con clones de ajo mantenidos bajo condiciones de cultivo *in vitro* sobre indicadores de germinación

**Table 4:** Effect of isolated microorganisms in interaction with garlic clones maintained under *in vitro* culture conditions on germination indicators

Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.). Variedad T-60.				
Tratamiento	Germinación (%)	Índice de germinación	Velocidad de germinación	Índice vigor
14.2	96,0 a	55,33 a	0,56 a	1080,35 ab
15.3	95,3 a	55,88 a	0,59 a	969,04 bc
15	94,0 a	50,17 ab	0,61 a	1092,11 a
6	94,7 a	55,67 a	0,66 a	1093,23 a
15.8	92,7 a	50,39 ab	0,63 a	1014,51 abc
11	92,0 a	54,17 ab	0,66 a	975,9 bc
<i>A. chroococcum</i>	92,7 a	55,22 a	0,69 a	1020,01 abc
<i>B. megatherium</i>	94,0 a	47,83 bc	0,60 a	1004,07 abc
<i>G. diazotrophicus</i>	95,3 a	55,11 a	0,66 a	1054,85 abc
Testigo	90,7 a	41,05 c	0,59 a	960,9 c
Esx	2,160	2,409	0,047	38,561
Rábano ( <i>Raphanus sativus</i> L.). Variedad INIFAT C-88.				
Tratamiento	Germinación (%)	Índice de germinación	Velocidad de germinación	Índice vigor
14.2	41,3 ab	31,89 ab	0,79 a	178,14 bc
15.3	44,7 ab	31,78 a	0,79 a	195,08 bc
15	64,0 a	46,83 ab	0,69 a	363,65 ab
6	69,0 a	55,11 a	0,61 a	427,93 a
15.8	49,3 ab	33,22 ab	0,62 a	153,93 bc
11	50,7 ab	37,5 ab	0,78 a	349,53 abc
<i>A. chroococcum</i>	63,3 ab	45,22 ab	0,66 a	349,53 ab
<i>B. megatherium</i>	52,0 ab	32,56 ab	0,68 a	241,44 abc
<i>G. diazotrophicus</i>	58,6 ab	41,17 ab	0,74 a	219,46 abc
Testigo	22,33 b	24,28 b	0,62 a	120,71 c
Esx	14,082	10,343	0,066	75,660

Nota: Medias con letras distintas difieren según prueba de Rangos Múltiples de Duncan al 5% de significación.

**Tabla 4.** Efecto de microorganismos aislados en interacción con clones de ajo mantenidos bajo condiciones de cultivo *in vitro* sobre indicadores de germinación

**Table 4:** Effect of isolated microorganisms in interaction with garlic clones maintained under *in vitro* culture conditions on germination indicators

Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.). Variedad T-60.				
Tratamiento	Germinación (%)	Índice de germinación	Velocidad de germinación	Índice vigor
14.2	96,0 a	55,33 a	0,56 a	1080,35 ab
15.3	95,3 a	55,88 a	0,59 a	969,04 bc
15	94,0 a	50,17 ab	0,61 a	1092,11 a
6	94,7 a	55,67 a	0,66 a	1093,23 a
15.8	92,7 a	50,39 ab	0,63 a	1014,51 abc
11	92,0 a	54,17 ab	0,66 a	975,9 bc
<i>A. chroococcum</i>	92,7 a	55,22 a	0,69 a	1020,01 abc
<i>B. megatherium</i>	94,0 a	47,83 bc	0,60 a	1004,07 abc
<i>G. diazotrophicus</i>	95,3 a	55,11 a	0,66 a	1054,85 abc
Testigo	90,7 a	41,05 c	0,59 a	960,9 c
Esx	2,160	2,409	0,047	38,561

Rábano ( <i>Raphanus sativus</i> L.). Variedad INIFAT C-88.				
Tratamiento	Germinación (%)	Índice de germinación	Velocidad de germinación	Índice vigor
14.2	41,3 ab	31,89 ab	0,79 a	178,14 bc
15.3	44,7 ab	31,78 a	0,79 a	195,08 bc
15	64,0 a	46,83 ab	0,69 a	363,65 ab
6	69,0 a	55,11 a	0,61 a	427,93 a
15.8	49,3 ab	33,22 ab	0,62 a	153,93 bc
11	50,7 ab	37,5 ab	0,78 a	349,53 abc
<i>A. chroococcum</i>	63,3 ab	45,22 ab	0,66 a	349,53 ab
<i>B. megatherium</i>	52,0 ab	32,56 ab	0,68 a	241,44 abc
<i>G. diazotrophicus</i>	58,6 ab	41,17 ab	0,74 a	219,46 abc
Testigo	22,33 b	24,28 b	0,62 a	120,71 c
Esx	14,082	10,343	0,066	75,660

Nota: Medias con letras distintas difieren según prueba de Rangos Múltiples de Duncan al 5% de significación.

La aplicación de las PGPB sobre las semillas de tomate y rábano también provocó distintos efectos en el crecimiento de la plántula. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Se destacan los aislados 14.2, 6 y 11 en el tomate; mientras que para el rábano repite el microorganismo nombrado 6 y se incorpora el 15.

**Tabla 5:** Efecto de microorganismos aislados en interacción con clones de ajo mantenidos bajo condiciones de cultivo *in vitro* sobre el crecimiento de plántulas.

**Table 5:** Effect of isolated microorganisms in interaction with garlic clones maintained under *in vitro* culture conditions on seedling growth.

Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.). Variedad T-60.		
Tratamiento	Largo de la radícula (cm)	Largo del hipocótilo (cm)
14.2	6,47 ab	4,75 ab
15.3	5,49 c	4,69 ab
15	6,82 a	4,83 ab
6	6,84 a	4,91 a
15.8	6,04 bc	4,83 ab
11	5,74 bc	4,88 ab
<i>A. chroococcum</i>	6,37 ab	4,79 ab
<i>B. megatherium</i>	6,06 bc	4,85 ab
<i>G. diazotrophicus</i>	6,39 ab	4,61 b
Testigo	5,73 bc	4,64 b
Esx	0,2669	0,0983
Rábano ( <i>Raphanus sativus</i> L.). Variedad INIFAT C-88.		
Tratamiento	Largo de la radícula (cm)	Largo del hipocótilo (cm)
14.2	2,78 ab	1,98 abcd
15.3	2,44 abcd	1,61 d
15	2,62 abc	2,13 abc
6	2,78 ab	2,24 ab
15.8	1,76 d	1,94 bcd
11	2,75 ab	2,32 a
<i>A. chroococcum</i>	3,03 a	1,94 bcd
<i>B. megatherium</i>	2,23 bcd	1,88 bcd
<i>G. diazotrophicus</i>	1,86 cd	1,71 d
Testigo	1,85 c	1,72 cd
Esx	0,2834	0,1414

Nota: Medias con letras distintas difieren según prueba de Rangos Múltiples de Duncan al 5% de significación.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se seleccionó el microorganismo 6, el que se caracterizó a partir de indicadores morfológicos y fisiológicos, resultados que se muestran en las Tablas 6 y 7.

## DISCUSIÓN

La mayor parte de los microorganismos que se aislaron desde los clones de ajo proporcionados por el Banco de Germoplasma del INIFAT procedieron del medio de cultivo, con una representatividad del 76 % contra un 24% asociado directamente al material ve-

getal. Ello pudiera estar asociado a que los nutrientes que se encuentran en el medio de cultivo no favorecen solamente el crecimiento del bulbillo, sino también el crecimiento microbiano, por los nutrientes que presentan en su composición. Además, los propios exudados que libera la bajo estas condiciones contribuyen al establecimiento de una comunidad microbiana asociada. Al respecto se describe la presencia de microorganismos endófitos y epífitos asociados a las especies vegetales aun después de la desinfección del material para el cultivo *in vitro*.

**Tabla 6:** Características morfológicas del aislado 6 proveniente de bulbos de ajo mantenidos bajo condiciones de cultivo *in vitro*.

**Table 6:** Morphological characteristics of isolate 6 from garlic bulbs maintained under *in vitro* culture conditions.

Características macromorfológicas				Características micromorfológicas	
<b>Forma</b> circular	<b>Bordes</b> irregular	<b>Consistencia</b> seca	<b>Elevación</b> ligeramente levantada	<b>Color</b> beige	<b>Tinción Gram</b> Negativa

**Tabla 7:** Características fisiológicas del aislado 6 proveniente de bulbos de ajo mantenidos bajo condiciones de cultivo *in vitro*

**Table 7:** Physiological characteristics of isolate 6 from garlic bulbs maintained under *in vitro* culture conditions

catalasa	oxidasa	gelatina	almidón	Indol	Kligler	RM	citrato
+	+	+	+	-	-	-	-

Por ejemplo, Bedoya *et al.* (2016) reflejaron en sus investigaciones contaminaciones microbianas entre 10 y 94 %, en dependencia del protocolo utilizado para la desinfección de *Aloysia tryphilla*. Por su parte Indacocha *et al.* (2018), informaron la presencia de hongos y bacterias en la multiplicación *in vitro* de especies forestales. Para el caso particular del ajo también se describen diferentes microorganismos asociados a su reproducción por métodos de cultivo *in vitro*, donde sobresalen bacterias, hongos, fitoplasmas y virus como el complejo carlavirus o potyvirus (Parra *et al.*, 2014).

De los 19 microorganismos purificados, seis mostraron resultados positivos para la fijación biológica de nitrógeno (FBN) según los criterios de Pérez *et al.* (2014), autores que sugieren que el crecimiento de los microorganismos en medios de cultivo carente de ni-

trógeno puede indicar la capacidad de FBN. Estos microorganismos (cinco de ellos) proceden del medio de cultivo, lo que permite suponer que son bacterias diazótroficas asociadas al ajo que logran sobrevivir el proceso de desinfección a que se somete el material vegetal.

La FBN es uno de los mecanismos que utilizan las bacterias promotoras del crecimiento vegetal para ejercer un efecto positivo en su interacción con las plantas (Palacio *et al.*, 2016). En el caso del cultivo *in vitro*, se han utilizado bacterias fijadoras de nitrógeno para mejorar la multiplicación y la elongación del tallo de caña de azúcar (*Sacharum officinarum* L.), así como para favorecer la regeneración de callos en medios de cultivo carentes de este nutriente. Por ejemplo, la inoculación en caña de azúcar antes de la fase de aclimatación de un producto mixto a base de bacterias

diazótrofos provocó resultados positivos (Martínez de Oliveira *et al.*, 2006). Es por ello que el aislamiento de candidatos fijadores de nitrógeno constituye un resultado relevante que puede tener una aplicación práctica en el cultivo *in vitro* de ajo.

En la promoción del crecimiento vegetal sin embargo, intervienen otros mecanismos además de la FBN, donde se incluye la solubilización de nutrientes y la actividad antagonista (Odoh, 2017). La solubilización de fosfatos es un mecanismo directo de estimulación del crecimiento que tiene gran importancia para la agricultura por el papel que tiene el fósforo para el metabolismo de las plantas. Su disponibilidad favorece también el desarrollo del proceso de FBN (Ahemad y Kribet, 2014), por lo que constituye un resultado importante que todos los microorganismos diazótrofos también demostraran potencial para solubilizar fosfatos.

Una vez aplicados los seis microorganismos seleccionados por su comportamiento en el ensayo de FBN sobre las semillas de tomate se mostró una respuesta diferente en dependencia del aislado presente. Igualmente sucedió para el caso del rábano. En otros trabajos de investigación se asocia el efecto de las PGPB sobre los indicadores de germinación a la acción de giberelinas, compuestos que activan la expresión de enzimas que promueven el inicio de este proceso, como por ejemplo, las amilasas. En los indicadores de vigor, su estimulación se relaciona con la presencia de auxinas (Gholami *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta la acción del aislado 6 sobre ambos indicadores en las dos especies vegetales, se podría suponer que este microorganismo se destaca por la producción de fitohormonas, máxime cuando las condiciones experimentales empleadas permitieron posiblemente que este fuera el mecanismo de mayor contribución en la promoción del crecimiento vegetal al limitar la presencia de nutrientes para llevar a cabo otros procesos de estimulación del crecimiento, como la solubilización.

Ríos *et al.* (2011) demostraron que las cepas *A. chroococcum* y *B. megatherium* empleadas en el estudio liberan al medio de cultivo concentraciones de AIA de 8 y 13  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Para el caso de la cepa de *G. diazotrophicus* se refieren valores cercanos a los 17  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Ríos *et al.*, 2016). La superioridad en cuanto a estimulación del crecimiento de las especies vegetales después de la inoculación de algunas de las bacterias aisladas desde los clones de ajo indica que podrían liberar altas concentraciones de la fitohormo-

na y probablemente más de una de ellas, teniendo en cuenta que para las PGPB se describe también la capacidad de producir giberelinas y citoquininas (Vega *et al.*, 2016).

En el caso del crecimiento de la plántula también las diferencias que se apreciaron entre los microorganismos podría estar relacionada con la complejidad de la interacción planta-PGPB, proceso donde intervienen factores que incluyen desde los mecanismos de estimulación del crecimiento que presentan los microorganismos, hasta las señales químicas que emite la especie vegetal, su genotipo y estadio fisiológico (Rojas *et al.*, 2015; González y Fuentes, 2017). La superioridad del aislado 6 sugiere que la bacteria es eficiente en la interacción, a partir de la activación probablemente, de varios de estos mecanismos.

Existen trabajos que relacionan la acción de las bacterias fijadoras de nitrógeno en sistemas de cultivo *in vitro*, con la producción de fitohormonas. Para el caso de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) por ejemplo, se han realizado inoculaciones con PGPB durante la fase de aclimatación y se demostró que cepas de *Azospirillum amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Paenibacillus* y *G. diazotrophicus* colonizaron las raíces de las plantas en estas condiciones e incrementaron el peso de la planta, el diámetro del tallo, la masa seca de tallos y raíces, el contenido de nitrógeno y además, la tolerancia del cultivo ante condiciones de estrés abiótico (Porto *et al.*, 2017). El aislado 6 podría utilizarse para realizar investigaciones al respecto utilizando el ajo como cultivo. El hecho de que se trate de un microorganismo aislado desde el interior del bulbillo podría constituir una ventaja al respecto teniendo en cuenta las características y potencialidades de las bacterias endófitas (Ahmad *et al.*, 2016). Otros estudios demuestran el efecto promotor del crecimiento de productos fermentados libres de células elaborados a partir de PGPB (Hernández *et al.*, 2010). Podría ser ésta una línea de investigación a profundizar utilizando el propio aislado 6, cuya aplicación podría sustituir la incorporación de fitohormonas en los medios para el cultivo *in vitro*.

Las características morfológicas y fisiológicas relacionadas en el estudio para el aislado 6, aunque no permiten su identificación taxonómica, pueden contribuir a ella si se utiliza taxonomía polifásica. Además, pueden ser la base en el futuro del control de calidad del microorganismo si se define conservar en alguna colección o que sea el principio activo de un nuevo

bioproducto para la agricultura cubana que se pueda incorporar para la obtención de clones de ajo en condiciones *in vitro* o su establecimiento satisfactorio en la fase de producción con mayores rendimientos. En otros estudios, como los realizados por Zhichang *et al.* (2017), se aíslan microorganismos endófitos desde ajo, pero a diferencia de este estudio, se corresponden con bacilos Gram positivos.

#### LITERATURA CITADA

- Ahemad, M y M, Kribet. (2014). Mechanism and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. Journal of King Saud University-Science. 26: 1-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>.
- Ahmad, I., M.M. Altaf., J. Sharma y A.S, Al/Thubiani. (2016). Diversity, quorum sensing and plant growth promotion by endophytic diazotrophs associated with sugarcane with special reference to *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Chapter 23. In: Plant-Microbe Interaction: An Approach to Sustainable Agriculture. DK Choudhary *et al* (eds). Springer Nature Singapore Pte Ltd. 495-509. [http://dx.doi.org/10.1007/978-981-10-2854\\_23](http://dx.doi.org/10.1007/978-981-10-2854_23).
- Almenares-Casanova Maybel, Pijeira-Fernández Gema, de la Fe-Pérez Yeised, Restrepo Franco Gloria M., Hernández-Rodríguez Annia (2020). Caracterización de bacterias diazotróficas solubilizadoras de fosfatos nativas de agroecosistemas arroceros cubanos. Rev. Cub. Cien. Biol. 8(1): 1-12.
- Bashan, Y., A. A. Kamnev y L.E. de-Bashan (2013). Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. Biol. Fertil. Soils, 49. 465-479.
- Bedoya, J.C., C. Y. Sánchez., S.M. Bermúdez y S, Ramírez. (2016). Estandarización de un protocolo de desinfección y establecimiento de cultivo *In vitro* de *Aloysia tryphilla*. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 14 (2): 38-46. [http://dx.doi.org/10.18684/BSAA\(14\)38-46](http://dx.doi.org/10.18684/BSAA(14)38-46).
- BIOCEN. (2013). Manual de Medios de Cultivo. La Habana. Centro Nacional de Biopreparados. BIOCEN.
- Edi-Premono, M., Moawad, M.A., Vleck, P.L.G. (1996). Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. Indones. J. Agric. Sci.11: 13-23
- Gholami, A., S, Shahsavani y S, Nezarat. (2009).The effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Germination, Seedling Growth and Yield of maize. World Academy Science, Engineering and Technology. 49: 19-24.
- González, H y N, Fuentes. (2017). Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal. Rev. Cienc. Agr. 34 (1):17 - 31. <http://dx.doi.org/10.22267/rcia.173401.61>.
- Harrigan, W.F y M, Mc Cance. (1968). Métodos de Laboratorio de Microbiología. (ed). Academia, España.
- Hernández, A., M, Heydrich., B, Diallo., M, El Jaziri., *et al.* (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. <http://dx.doi.org/10.1007/s10725-009-9433-5>.
- Indacochea, I., J, Parrales., A, Hernández., C, Castro., *et al.* (2018). Evaluación de medios de cultivo *in vitro* para especies forestales nativas en peligro de extinción en Ecuador. Agron. Costarric. 42(1): 63-89.
- Martínez de Oliveira, A. L., E, de Lima., S, Urquiaga., V, Massena., *et al.* (2006). Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. Plant Soil. 284:23-32. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-006-0025-0>
- Martínez, V. R., M, López., F. M, Brossard., G, Tejada., *et al.* (2006). Procedimientos para el estudio y fabricación de Biofertilizantes Bacterianos. Ed. INIA - Maracay. Venezuela, 88 pp.
- Moeinzadeh, A., F, Sharif-Zahed., M, Ahmadzadeh y F, Heidari Tajabadi. (2010). Biopriming of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed with *Pseudomonas fluorescens* for improvement of seed invigoration and seedling growth. Aust. J. Crop Sci. 4 (7): 564-570.
- Odoh, C. K. (2017). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A bioprotectant bioinoculant for sustainable agrobiology. A review. Int. J. Adv. Res. Biol. Sci. 4 (5): 123-142.
- Palacio, R., B.P, Ramos., J.R, Coria., B, Nava., *et al.* (2016). Mecanismos de las PGPR para mitigar el estrés abiótico de plantas. Árido-Ciencia. 1 (1): 4-11.
- Parra, M., C, Reyes y J, Hernández. (2014). Detección molecular de potyvirus en hojas y miníbullos de ajo, *Allium sativum*, asociados a un programa de producción de semilla limpia. Rev. Colomb. Biotecnol. 16 (2): 30-36.
- Pérez, A; A, Tuberquia y D, Amell. (2014). Actividad *in vitro* de bacterias endófitas fijadores de nitrógeno y solubilizadores de fosfato. Agron. Mesoam. 25 (2): 13-223.
- Porto, E.A., F.A, Brayner., L.C, Alves, J.E, Lopes., *et al.* (2017). Acclimatization of Manihot esculenta Crantz Seedlings Inoculated *in vitro* with Plant Growth-Promoting Bacteria. Advances in Plants and Agriculture Research. 7 (5): 11 pp. <http://dx.doi.org/10.15406/apar.2017.07.00270>.
- Ríos, Y., M, Ortega., M, Rojas., D, Lugo., *et al.* (2011). Caracterización de cepas bacterianas con potencial para la elaboración de biofertilizantes. Agrotecnia de Cuba. 24 (1). 9-12. ISSN digital: 2414- 4673.
- Ríos, Y., M, Rojas., M, Ortega., B, Dibut. (2016). Aislamiento y caracterización de cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Cultivos Tropicales. 37 (1): 34-39.
- Rojas, M. M., A. J, Rodríguez., J, González y M, Heydrich. (2015). Influencia de diferentes factores en el crecimiento de bacterias endófitas de caña de azúcar. Rev. Colomb. Biotecnol. 17 (2): 149-155.
- Vega, P., M.H, Canchignia., M, González y M, Seeger. (2016). Biosíntesis de ácido indol 3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. Cult.Trop. 37: 33-39.
- Zhichang, Q., L, Xiaoming., L, Ningyang., Z, Mingjie., *et al.* (2017). Characterization of garlic endophytes isolated from the black garlic processing. MicrobiologyOpen. 7(1), e00547. <https://doi.org/10.1002/mbo3.547>.

