

"EFECTO DE DOS CEPAS DE *Pseudomonas putida* EN ALGUNOS PARÁMETROS DEL CRECIMIENTO DE TRES VARIEDADES COMERCIALES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)"

Narovis Rives¹, Yudell García¹, Marlene Vega¹, Estrella Díaz¹, Ibis Arteaga¹ Yanelis Acebo²
y Annia Hernández²

1. Instituto de Investigaciones de Granos, Cuba. Email: narovis@iiarroz.cu,

2. Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba

Introducción

Las Bacterias Promotoras del crecimiento Vegetal (PGPB) pueden promover el crecimiento de las plantas por diferentes vías; de forma directa esta acción se evidencia en ausencia de otros microorganismos, mientras que los mecanismos indirectos se pueden observar en la interacción del microorganismo de interés con un fitopatógeno (Thrane *et al.*, 2000). Los efectos directos de las PGPB pueden ser: fijación del nitrógeno atmosférico (que es captado por la planta y que puede llegar a suplir hasta un 70% de sus necesidades, según Mantelin y Touraine, (2004), producción de sideróforos (Bolwerk *et al.*, 2003), solubilización de minerales (Fernández *et al.*, 2005) y síntesis de fitohormonas (Barea *et al.*, 2005, Han *et al.*, 2007). Se ha observado además su influencia en la absorción de elementos minerales debido a incrementos en los flujos iónicos de la superficie de las raíces en presencia de PGPB (Nelson, 2004). Dentro de los grupos microbianos potencialmente eficientes para la elaboración de inoculantes microbianos, se encuentran las pseudomonas fluorescentes, que han sido descritas como excelentes agentes fitoestimuladores y de control biológico por numerosos autores. Teniendo en cuenta este aspecto, este trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto promotor del crecimiento vegetal de dos cepas de *Pseudomonas putida* en 3 variedades comerciales de arroz y determinar algunos de sus mecanismos de acción.

Materiales y Métodos

Material vegetal: Se emplearon semillas de tres variedades comerciales de arroz (INCA -LP5, Perla de Cuba e IACUBA 25).

Cepas empleadas: En este estudio se emplearon dos cepas de *Pseudomonas putida* (AJ13, AI05) previamente aisladas de la rizosfera del arroz de las variedades Jucarito-104 e INCA LP5 identificadas mediante métodos convencionales (API 20NE) y moleculares (PCR) por Acebo *et al.* (2008).

Determinación de la producción de ácido indolacético y solubilización de fosfatos: Para la determinación de la producción de auxinas del tipo AIA, se inocularon tubos con 5mL de Caldo Triptona Soya suplementado con triptófano (0.1g·L⁻¹) con 500 µL de una suspensión bacteriana en salina fisiológica de cada aislado ajustada a una concentración celular de 10⁸cel/mL. Se incubaron por 48 horas y se centrifugó el contenido de los tubos a 5000 rpm por 15 minutos (Centrifuge 5702, Eppendorf). A los cultivos libres de células se les añadió en condiciones de oscuridad el reactivo de Salkowski (600mL de H₂SO₄ 18M, 4.5g de FeCl₃ anhidro, 400 mL de agua destilada) en una relación 1:1. Se incubó durante 30 minutos en la oscuridad y luego se leyó la absorbancia a 530nm en un espectrofotómetro (Genesys 20, Thermospectronic). El experimento se repitió 4 veces a razón de 5 réplicas por aislado. Paralelamente se elaboró una curva patrón con AIA sintético, utilizando las concentraciones: 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80 y 100µg/mL, a la que se le determinó la ecuación ($y = 0.0213 \cdot x$).

Para la determinación de la capacidad de solubilización de fósforo inorgánico de los aislados, se utilizó el medio NBRIP (Mehta y Nautiyal, 2001). A partir de cultivos de 24 horas en medio LB líquido, se tomaron 10µL y se inocularon en placas de medio NBRIP sólido. Se incubaron a 30°C de 24 hasta 120 horas, tomando como positivos aquellos aislados en los que apareció un halo claro y cambio de coloración del medio alrededor de la colonia.

Bioensayo de promoción del crecimiento: Este bioensayo se realizó en el Instituto de Investigaciones de Granos en condiciones semicontroladas. Las semillas previamente desinfectadas de cada variedad se sumergieron en los inóculos bacterianos (caldo libre de células) durante 45 minutos y posteriormente se sembraron en bandejas plásticas con suelo como sustrato. Se estableció un tratamiento control (agua estéril) y se realizaron mediciones del largo de la raíz, altura de la planta y masa fresca y seca de raíz y parte aérea a los 21 días. Se establecieron 5 réplicas por tratamiento y el experimento se repitió tres veces.

Resultados y discusión

Determinación de la producción de ácido indolacético y solubilización de fosfatos: Dentro de los mecanismos por los cuales las rizobacterias pueden manifestar su acción se destacan la producción de compuestos indólicos, a los cuales se les atribuye el incremento en el desarrollo y rendimiento de diversas especies de plantas. Los microorganismos, en sentido general, utilizan el triptófano como precursor para la síntesis de auxinas del tipo ácido-3-indolacético, tal y como se evidencia en las diferentes vías que involucran la indol-3-acetamida, el ácido indol-3-pirúvico, el triptofol, la triptamina y la indol-3-acetaldoxima, respectivamente (Gravel *et al.*, 2007). En la Tabla 1 se muestran los resultados de la producción de AIA por las cepas de *P. putida* empleadas en el estudio, los que no presentaron diferencias significativas entre ellas. Los niveles de producción de esta hormona obtenidos en el presente trabajo son elevados si se comparan con los encontrados por Hernández (2002) y por Trujillo *et al.* (2005), con cepas de *Pseudomonas fluorescens* aisladas de la rizosfera del cultivo del maíz.

Tabla 1. Producción de AIA por las cepas de *Pseudomonas putida* estudiadas.

CEPAS	AIA ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)
<i>P. putida</i> AJ13	47.2 a
<i>P. putida</i> AI05	49.6 a

La utilización del medio NBRIP para la cuantificación de la eficiencia de solubilización de fosfatos ha sido ampliamente validada por numerosos autores (Mehta y Nautiyal, 2001). La adición de un indicador de pH como el bromofenol azul es de gran utilidad en estos estudios ya que permite observar adicionalmente la producción de ácido en el medio. En la figura 1 se observa que ambas cepas tienen la capacidad de solubilizar fosfato tricálcico y se observa la liberación de ácido al medio, por el cambio de color del indicador de azul a amarillo.

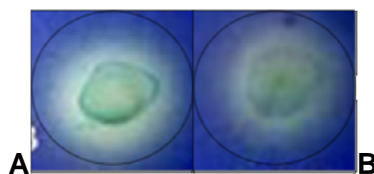


Figura 1. Fotografía que muestra la solubilización de fosfato en medio NBRIP sólido (suplementado con bromofenol azul). A (AJ13), B (AI05).

En la presente investigación, se demostró que las cepas en estudio tienen potencialidades para ser utilizadas en la solubilización de fosfato inorgánico. De igual manera, otros autores han informado que la inoculación con bacterias del género *Pseudomonas* con la capacidad de solubilizar fosfato inorgánico ha resultado beneficiosa para diversos cultivos, tales como maíz, soya, alfalfa y col (Poonguzhali *et al.*, 2008, Rosas *et al.*, 2006, Hameeda *et al.*, 2008).

Bioensayo de promoción del crecimiento: De modo general, los microorganismos promotores del crecimiento vegetal desempeñan un papel clave en la toma de nutrientes, tolerancia al estrés ambiental y en general en el mantenimiento de la salud radicular, favoreciendo así el aumento en el rendimiento de los cultivos (Bloemberg y Lugtenberg,

2001;Matiru y Dakora, 2004). En el presente estudio, se determinó la capacidad fitoestimuladora de las cepas seleccionadas sobre plántulas de arroz de 21 días de edad, mediante la medición de la altura de las plantas, la longitud de la raíz más larga y la masa (fresca y seca) de la raíz y de la parte aérea. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Mediciones de los parámetros de promoción del crecimiento vegetal. Tratamientos: Variedades inoculadas con cada una de las cepas y Control sin inocular de cada variedad.

Variedades Tratamientos		Parámetros de promoción del crecimiento					
		Masa fresca (mg)		Masa seca (mg)		Longitud (cm)	
		Raíz	Aéreo	Raíz	Aéreo	Raíz	Aéreo
INCA-LP5	AJ13	79,78 ± 6,38 a	74,57 ± 7,36 a	14,14 ± 0,36 a	10,64 ± 1,59 a	9,78 ± 0,45 a	31,30 ± 0,76 b
	AI05	81,42 ± 8,95 a	68,64 ± 4,97 b	13,93 ± 1,18 a	9,93 ± 1,61 a	9,68 ± 0,63 a	33,23 ± 0,91 a
Perla de Cuba	AJ13	84,40 ± 6,18 a	74,90 ± 7,64 a	15,42 ± 0,85 a	12,07 ± 1,54 a	9,47 ± 0,65 a	33,73 ± 0,99 a
	AI05	75,84 ± 6,22 b	75,57 ± 5,72 a	14,27 ± 1,06 ab	10,71 ± 1,13 b	9,97 ± 0,62 a	31,10 ± 0,57 b
IACUBA 25	AJ13	77,68 ± 6,85 a	84,07 ± 5,31 a	13,35 ± 0,74 a	9,50 ± 1,16 b	4,80 ± 0,38 b	30,90 ± 0,65 b
	AI05	75,19 ± 6,61 a	72,38 ± 5,71 b	14,21 ± 0,69 a	11,57 ± 2,10 a	8,41 ± 0,47 a	32,14 ± 1,05 a
Control	INCA-LP5	69,33 ± 3,84 b	67,54 ± 5,24 b	10,07 ± 0,82 b	7,28 ± 0,82 b	6,18 ± 0,60 b	25,27 ± 0,66 c
	Perla de Cuba	68,25 ± 5,32 c	70,24 ± 3,22 b	13,05 ± 0,60 b	8,28 ± 0,42 c	7,20 ± 0,32 b	27,25 ± 0,43 c
	IACUBA 25	70,13 ± 3,33 b	70,22 ± 4,03 b	11,07 ± 0,82 b	7,28 ± 0,62 c	5,18 ± 0,50 b	24,21 ± 0,36 c

En este trabajo, se demostró que la inoculación bacteriana favorece el desarrollo del sistema radical y de la parte aérea de las plantas de arroz, observándose diferencias significativas de los tratamientos inoculados con las cepas con respecto al los tratamientos controles en cada una de las variedades estudiadas. Asimismo, se observa un efecto beneficioso de la inoculación bacteriana con las cepas de *P.putida* sobre la masa fresca y la masa seca de las raíces.

La masa fresca aérea de las plantas inoculadas también fue estimulada en la mayoría de los tratamientos con inoculación, con relación al control sin inocular, destacándose en este caso la variedad Perla de Cuba inoculada con ambas cepas por los mejores resultados. En cuanto a la masa seca aérea, en las tres variedades hubo notables incrementos de este parámetro en los tratamientos inoculados con respecto a los controles.

Al hacer un análisis integral de los resultados mostrados en el bioensayo (Tabla 2), se demuestra el efecto promotor del crecimiento vegetal de las cepas de *P.putida*, lo que podría estar relacionado con la producción de auxinas del tipo AIA por estas. En este trabajo se demostró que las mismas producen cantidades suficientes de este metabolito como para ejercer un efecto beneficioso cuando son inoculadas en variedades de arroz.

La producción de auxinas se encuentra entre los mecanismos de acción más estudiados entre las bacterias rizosféricas, demostrándose su impacto en la promoción del crecimiento en los cultivos. Mantelin y Touraine (2004) señalaron la importancia de este mecanismo en el desarrollo del sistema radical del cultivo y la toma de nitrato y otros nutriente por la planta. Asimismo, la capacidad de solubilización de fosfatos mostrada por las cepas, podría estar influyendo en estos resultados, tal y como demostraron Hameeda et al. (2008), al utilizar rizobacterias solubilizadoras de fosfatos para aumentar los rendimientos en el cultivo del maíz.

Conclusiones

- Las cepas de *P.putida* estudiadas tienen la capacidad de producir auxinas (hasta 50 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) y solubilizar fosfato inorgánico.
- Se demostró el efecto promotor del crecimiento vegetal de las cepas de *P.putida* AJ13 y AI05 en las tres variedades comerciales de arroz empleadas en el estudio, manifestándose notables incrementos en los parámetros del crecimiento evaluados.

Referencias Bibliográficas

- Barea JM, Pozo MJ, Azcón R, Azcón-Aguilar. C. 2005.** Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 56(417):1761-1778.
- Bloemberg GV, Lugtenberg. BJJ. 2001.** Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology* 4:343-350.
- Bolwerk A, Lagopodi AL, Wijfjes AHM, Lamers GEM, Chin-A-Woeng TFC, Lugtenberg BJJ, Bloemberg. GV. 2003.** Interactions in the Tomato Rhizosphere of Two *Pseudomonas* Biocontrol Strains with the Phytopathogenic Fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *MPMI* 16(11):983-993.
- Fernández LA, Zalba P, Gómez MA, Sagardoy. MA. 2005.** Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *CI. Suelo (Argentina)* 23(1):31-37.
- Gravel V, Antoun H, Tweddell RJ. 2007.** Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology & Biochemistry* 39:1968-1977.
- Hameeda B, Harini G, Rupela OP, Wani SP, Reddy G. 2008.** Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiological Research* 163(2):234-242.
- Han J, Sun L, Dong X, Cai Z, Sun X, Yang Y, Wang Y, Song YW. 2005.** Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Systematic and Applied Microbiology* 28:66-76.
- Hernández, A. (2002).** Obtención de un bioestimulador del crecimiento vegetal a partir de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz (*Zea mays* L). Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.
- Mantelin, S. y Touraine, B. (2004)** Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *Journal of Experimental Botany*, **55**(394):27-34.
- Matiru, V.N. y Dakora, F. (2004).** Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. *African Journal of Biotechnology* 3: 1-7.
- Mehta S, Nautiyal CS. 2001.** An Efficient Method for Qualitative Screening of Phosphate-Solubilizing Bacteria. *Current Microbiology* 43:51-56.
- Nelson, L. M. (2004).** Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants. Online. Crop Management, Plant Management Network.
- Poonguzhali S, Madhaiyan M, Sa T. 2008.** Isolation and Identification of Phosphate Solubilizing Bacteria from Chinese Cabbage and Their Effect on Growth and Phosphorus Utilization of Plants. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18(4):773-777.
- Rosas SB, Andrés JA, Rovera M, Correa NS. 2006.** Phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* can influence the rhizobia-legume symbiosis. *Soil Biology and Biochemistry* 38(12):3502-3505.
- Thrane, C., Harder Nielsen, T., Neiendam Nielsen, M. and Sørensen, J. 2000.** Viscosinamide-producing *Pseudomonas fluorescens* DR54 exerts a biocontrol effect on *Pythium ultimum* in sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* 33: 139-146.
- Trujillo I, Hernández A, Díaz A, Heydrich M. 2005.** *Pseudomonas* and *Burkholderia* strains

selection for rice pathogen biocontrol. Memorias Congreso Internacional del Arroz. 4p. ISBN 959-7164-91-4. 6.