



Acercamiento en la identificación de rizobios rizosféricos de arroz (*Oryza sativa L.*) cultivar “INCA LP-7”

Approach in the identification of rhizospheric rhizobia of rice (*Oryza sativa L.*) cultivar “INCA LP-7”

Arasay Santa Cruz-Suárez*, Lionel Hernández-Forte

Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), carretera San José-Tapaste, km 3½, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. CP 32 700.

RESUMEN: En Cuba existen pocos estudios sobre la interacción de los rizobios con el arroz. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar posibles rizobios provenientes de la rizosfera de plantas de arroz del cultivar “INCA LP-7”. Se caracterizaron 16 aislados bacterianos desde el punto de vista cultural, morfológico y bioquímico. Todos los aislados bacterianos produjeron colonias mucosas en medio levadura manitol; sin embargo, difirieron en tamaño y coloración. La tinción de Gram reveló que la mayoría de estos resultaron ser coccobacilos Gram negativos no esporulados. Algunos aislados resultaron negativos a la cetoacetasa, produjeron ácido y crecieron en medios libre de nitrógeno. Se concluye que en la rizosfera de plantas de arroz del cultivar “INCA LP-7”, residen poblaciones de rizobios presuntivamente de la familia Rhizobiaceae, con potencialidades en la promoción del crecimiento vegetal.

Palabras clave: fenotipo, fijación de nitrógeno, gramíneas, *Rhizobium*.

ABSTRACT: There are few studies about rhizobia rice interaction, in Cuba. The aim of this work was to characterize possible rhizobia from rice plant rhizosphere of cultivar “INCA LP-7”. Sixteen bacterial isolates were characterized from a cultural, morphological and biochemical point of view. All bacterial isolates produced mucous in mannitol yeast medium; however, they had different size and color. Gram stain revealed that most of these isolates were Gram-negative and non-sporulated coccobacilli. Some isolates did not produce for cetoacetase enzyme, produced acid and grew in nitrogen-free media. It is concluded that in rice plant rhizosphere of cultivar “INCA LP-7”, reside rhizobia populations from Rhizobiaceae family presumably, with potentials in promoting plant growth.

Key words: phenotype, nitrogen fixation, grasses, *Rhizobium*.

INTRODUCCIÓN

En Cuba se consume un promedio anual de 72 kg de arroz (*Oryza sativa L.*) por persona, uno de los más altos en América Latina (1). Las importaciones del grano cubren el 66 % de la demanda nacional (2). Esta problemática motivó el desarrollo de nuevas variedades de arroz, más resistentes a los fitopatógenos y con mayor potencial de rendimiento. El cultivar de arroz “INCA LP-7”, desarrollado en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), es un ejemplo de ello y ocupa el 8 % del área total dedicada al cultivo en el país (682 ha) (3).

El arroz tiene la capacidad fisiológica de absorber solo 50 kg N ha⁻¹ (4). El resto del fertilizante nitrogenado que se aplica al cultivo produce graves problemas de contaminación (5). El empleo de Bacterias Promotoras del

Crecimiento Vegetal (BPCV) se ha venido empleando como una alternativa a la fertilización mineral (6). Los rizobios son BPCV que se han estudiado por la asociación simbiótica que realizan con las plantas leguminosas (7). Sin embargo, en los últimos años se ha constatado que estos microorganismos también promueven el crecimiento de las gramíneas como el arroz (8).

Actualmente, no existen evidencias científicas en Cuba sobre la presencia de los rizobios como parte de la rizosfera de plantas de arroz del cultivar “INCA LP-7”, lo cual dificulta el desarrollo de bioproductos a base de estos microorganismos que permitan disminuir la fertilización mineral al cultivo e incrementar los rendimientos. El objetivo de esta investigación fue caracterizar posibles rizobios provenientes de la rizosfera de plantas de arroz del cultivar “INCA LP-7”.

*Autor para correspondencia: arasay@inca.edu.cu

Recibido: 14/10/2019

Aceptado: 09/12/2020

Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC 4.0). <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon 16 aislados bacterianos, provenientes de la rizosfera de plantas de arroz del cultivar "INCA LP-7" que, presuntivamente, pertenecen al grupo de los rizobios (9).

Caracterización cultural y morfo-tintorial de bacterias rizosféricas, provenientes de plantas de arroz del cultivar "INCA LP-7"

Para la caracterización cultural, los aislados se cultivaron por agotamiento y por triplicado en el medio Levadura Manitol Agar (LMA) (10) con rojo Congo. Las placas se incubaron durante 48 h a 30 °C. Los parámetros a tener en cuenta fueron: el color, la mucosidad y el tamaño de la colonia. Se tomaron como colonias grandes aquellas cuyo diámetro estuvo entre 2-4 mm, colonias medianas entre 1-2 mm y colonias pequeñas cuyo diámetro correspondiera con 1 mm. La caracterización morfo-tintorial se realizó mediante Tinción de Gram y se determinó la morfología de la célula, la respuesta a la tinción y la presencia de endosporas.

Caracterización bioquímica de bacterias rizosféricas, provenientes de plantas de arroz del cultivar "INCA LP-7"

Ensayo de la cetolactasa

Los aislados bacterianos se cultivaron por agotamiento y por triplicado en medio Levadura-Lactosa-Agar (LLA) (11) y las placas se incubaron a 30 °C durante siete días. Posteriormente, se añadieron 10 mL del reactivo de Benedict sobre el crecimiento bacteriano y se observó cambios de coloración del medio a los 10 min de incubación a temperatura ambiente. El resultado positivo a esta prueba se consideró ante un cambio de coloración del medio de azul a amarillo y negativo si el medio mantenía la coloración azul.

Producción de ácido y base

Los aislados bacterianos se cultivaron por agotamiento y por triplicado en medio LMA con indicador azul de bromotimol (0,5 % en NaOH 0,016N) y las placas se incubaron durante tres días a 30 °C. El cambio de coloración del medio de verde a amarillo se interpretó como la producción de ácido y de color verde a azul, se consideró como la producción de base (12).

Crecimiento en medios de cultivo libre de nitrógeno

Se prepararon suspensiones de los aislados bacterianos. Para ello, se resuspendieron varias colonias en 1 mL de solución salina de NaCl (0,9 % (m/v)) estéril. Cien microlitros de las suspensiones se inocularon en frascos que contenían 10 mL de los medios semisólidos carentes de nitrógeno (13,14). La inoculación se realizó introduciendo la punta de una micro pipeta en el interior de los medios de cultivo y posteriormente se fue liberando la suspensión bacteriana desde el interior del medio hasta su superficie. Se empleó

como control positivo frascos que se inocularon con el mismo volumen de un inoculante a base de *Bradyrhizobium elkanii* ICA 8001, cepa de referencia en la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) en soya (*Glicine max* L.) (15).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Poblaciones bacterianas rizosféricas del cultivar de arroz "INCA LP-7", similares desde el punto de vista cultural, difieren en sus características morfo-tintoriales

Todos los aislados produjeron colonias mucosas en medio LMA. Sin embargo, definieron en tamaño y coloración (Tabla 1). Resultados similares se encontraron en estudios anteriores con colecciones bacterianas provenientes de frijol chileno (*Lablab purpureus* (L.) Sweet) y de guisante (*Pisum sativum*) (16,17).

El 87,5 % de los aislados resultaron cocobacilos; Gram negativos y no esporulados. Los aislados 1LL y 5FF2, que constituyen el 12,5 % restante, presentaron características culturales e incluso algunas morfológicas similares al resto. Sin embargo, ambos aislados resultaron Gram positivos. Los rizobios, generalmente, son cocobacilos no esporulados y Gram negativos (18), por lo cual los aislados 1LL y 5FF2 se eliminaron de las determinaciones posteriores que se realizaron en esta investigación.

En la rizosfera de las plantas de arroz del cultivar "INCA LP-7" residen posibles rizobios con atributos positivos en la promoción del crecimiento vegetal

La respuesta a la cetolactasa fue el tercer indicador que se empleó para determinar si los aislados bacterianos en estudio pertenecían al grupo de los rizobios, luego de la caracterización cultural y morfo tintorial. Esta determinación fue por mucho tiempo un carácter fenotípico confiable, que permitió diferenciar la familia Rhizobiaceae del género *Agrobacterium*. Los rizobios y el género *Agrobacterium* tienen hábitats similares y comparten características culturales y morfolintoriales (19). *Agrobacterium* forma colonias mucosas y semitraslúcidas, a los 2-3 días en medio LMA y la tinción de Gram revela células en forma de bacilos Gram negativos y no esporulados. Este género produce agallas o tumores en las raíces y tallo de las plantas, estructuras muy similares a los nódulos que forman los rizobios en las leguminosas (20).

Todos los aislados que se seleccionaron en este trabajo como posibles rizobios, por sus características culturales y morfo tintoriales, resultaron negativos a la prueba de la cetolactasa. Evidencias científicas han permitido modificar la redistribución de numerosas especies de bacterias a otros grupos taxonómicos, pues constituyen excepciones a la norma que hasta ese entonces estuvo establecida. Por ejemplo, según el Manual de Bergey, especies que anteriormente se identificaron como *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium rubi* y *Agrobacterium vitis* son cetolactasa negativo y *Agrobacterium tumefaciens* es cetolactasa positivo (21).

Tabla 1. Caracterización cultural, morfo-tintorial y bioquímica de los aislados rizosféricos de plantas de arroz cultivar "INCA LP-7"

Aislados	Características culturales	Características Morfo-tintoriales	Producción ácido/base	Crecimiento en medios semisólidos libres de nitrógeno	
				JMV	Rennie
4S	Medianas, rosado pálido con centro rosa oscuro, mucosas	Cocobacilos, G-, no esporulados	ácido	+	+
4U	Grandes, blanquecinas, mucosas	Cocobacilos, G-, no esporulados	ácido	+	+
1DD1	Medianas, blanquecinas, mucosas	Cocobacilos, G-, no esporulados	ácido	+	+
1DD2	Medianas, blanquecinas, mucosas	Cocobacilos, G-, no esporulados	ácido	+	+
1AA	Grandes, blanquecinas, mucosas	Cocobacilos, G-, no esporulados	ácido	+	+
1LL	Grandes, blanquecinas, mucosas	Cocobacilos, G+, no esporulados	ND	ND	ND
3W	Pequeñas, rosado pálido, mucosas	Cocobacilos, G-, no esporulados	ácido	+	+
5FF1	Medianas, blanquecinas, mucosas	Cocobacilos, G-, no esporulados	base	+	+
5FF2	Grandes, blanquecinas, mucosas	Cocobacilos, G+, no esporulados	ND	ND	ND
5O	Medianas, translúcidas, mucosas	Cocobacilos, G-, no esporulados	ácido	+	+
5P1	Pequeñas, blanquecinas, mucosas	Cocobacilos, G-, no esporulados	ácido	+	+
GG1	Grandes, translúcidas, mucosas	Cocobacilos, G-, no esporulados	ácido	+	+
GG2	Medianas, rosado, mucosas	Cocobacilos, G-, no esporulados	ácido	+	+
II1	Pequeñas, translúcidas, mucosas	Cocobacilos, G-, no esporulados	ácido	+	+
II3	Grandes, translúcidas, mucosas	Cocobacilos, G-, no esporulados	ácido	+	+
II2	Grandes, translúcidas, mucosas	Cocobacilos, G-, no esporulados	ácido	+	+

G-, Gram negativo; G+, Gram positivo; ND, No determinado

Los métodos de biología molecular han permitido un mayor esclarecimiento de estos temas, de manera que estas tres especies de *Agrobacterium*, se encuentran en la actualidad dentro del género *Rhizobium* (22,23). Teniendo en cuenta éstas y otras evidencias científicas, se hace necesario emplear, además de las pruebas fenotípicas convencionales, la secuenciación del ARNr 16S para identificar los aislados bacterianos asociados a las plantas de ambos cultivares de arroz.

La producción de ácido/base fue otro de los criterios fenotípicos que se estudiaron en esta investigación. Excepto el aislado 5FF1, el resto produjo ácido al medio de cultivo. Los ácidos de origen microbiano actúan como sideróforos, moléculas que captan el hierro del suelo (24). Otros permiten la solubilización del fósforo e incrementan su disponibilidad para las plantas (25). El ácido indol 3-acético y el salicílico también constituyen ácidos que producen las BPCV, que incrementan el crecimiento de las plantas (26) e inducen respuestas defensivas en estas contra el ataque de patógenos (27), respectivamente.

Por otra parte, el crecimiento de los aislados bacterianos en medios de cultivo libres de nitrógeno se empleó como un acercamiento a la capacidad de estos para realizar la FBN. El 100 % de los aislados crecieron en los medios JMV y Rennie (Tabla 1). Estos resultados concuerdan con los que publicaron Quim *et al.* (26), con bacterias asociadas a plantas de arroz.

Los medios semisólidos carentes de nitrógeno se emplean sobre todo para restringir la búsqueda de microorganismos diazotróficos que se aíslan del suelo, rizosfera o del interior de los tejidos de las plantas (27). A partir de aquí, es necesario aplicar técnicas como la amplificación del gen *nifH* (28) y el ensayo de Reducción del Acetileno (ARA) (29), las

cuales permiten tener mayor seguridad de la capacidad de las bacterias para fijar el nitrógeno.

La FBN constituye uno de los mecanismos directos que emplean las BPCV para promover el crecimiento de las plantas (30). Los rizobios se han estudiado fundamentalmente por su capacidad para fijar el nitrógeno, en el contexto de la simbiosis con las leguminosas (31). La presencia de este atributo en los aislados de rizobios que se estudiaron en esta investigación permitiría emplearlos como parte de un biopreparado para arroz y así disminuir la aplicación de fertilizante nitrogenado al cultivo.

CONCLUSIONES

En la mayoría de los aislados provenientes de la rizosfera de las plantas de arroz cultivar "INCA LP-7", se identificaron aspectos fenotípicos presentes en la familia Rhizobiaceae. La caracterización cultural, morfo-tintorial y bioquímica permiten ubicarlos presuntivamente dentro de los géneros *Rhizobium*, *Ensifer* o *Shinella*. Sin embargo, es necesario combinar estos resultados con técnicas moleculares para confirmarlos. Los métodos moleculares y los estudios fenotípicos se complementan entre sí y constituyen lo que hoy se conoce como la taxonomía polifásica, herramienta que permite una mayor integralidad de los estudios taxonómicos de los microorganismos.

BIBLIOGRAFÍA

1. MINAG. El Arroz en La Economía Y Sociedad Cubana 'Internet'. Cuba y la Economía. 2016 'cited 21/12/2020". Available from: <https://cubayeconomia.blogspot.com/2016/10/el-arroz-en-la-economia-y-sociedad.html>

2. Rendón T. Cuba por aumentar producción de arroz y evitar importaciones 'Internet'. Agencia Cubana de Noticias. 'cited 21/12/2020". Available from: <http://www.acn.cu/economia/22803-cuba-por-aumentar-produccion-de-arroz-y-evitar-importaciones>
3. MINAG. Plan 2018-2019 de Producción de semilla de arroz en Cuba 'Internet". Ministerio de la Agricultura República de Cuba. 2019 'cited 21/12/2020". Available from: <https://www.minag.gob.cu/node/167>
4. Hernández I. Rizobios asociados a plantas de arroz *Oryza sativa* L.) cultivar INCA LP-5. Efecto en el crecimiento del cultivo. 'Tesis en opción al título académico de Máster en Ciencias en Microbiología". Universidad de La Habana, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas; 2015.
5. Villarreal-Núñez JE, Barahona-Amores LA, Castillo-Ortiz OA. Efecto de zeolita sobre la eficiencia de fertilizantes nitrogenados en el cultivo de arroz. *Agronomía Mesoamericana*. 2015;26(2):315-21.
6. INTAGRI. Los Biofertilizantes en la Agricultura 'Internet". 2017 'cited 21/12/2020". Available from: <https://www.intagri.com/articulos/agricultura-organica/biofertilizantes-en-agricultura>
7. Elzantaty AM, Hewedy OA, Nagaty HH, Abd Elbary MI. Molecular and Biochemical Characterization of Some Egyptian Genotypes *Rhizobium Vicia Faba* Isolates. *Journal of Bioengineering & Biomedical Sciences*. 2015;5(1):1.
8. Santa Cruz A. Efecto de inoculantes a base de rizobios sobre el crecimiento y el desarrollo de plantas de arroz *Oryza sativa* L. cultivar INCA LP-5. 'Tesis de Diploma". 'Mayabeque": Universidad Agraria de la Habana, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas; 2018.
9. Betancourt C. Aislamiento y caracterización de poblaciones rizosféricas y endófitas de semillas de plantas de arroz *Oryza sativa* L. cultivar "INCA LP-7". 'Tesis en opción al Título Académico de Licenciada en Ciencias de la Microbiología". Universidad de La Habana, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas; 2018.
10. Vincent JM. A manual for the practical study of root-nodule bacteria (No. 15). International Programme Handbook. Oxford, England; 1970.
11. Thies JE, Singleton PW, Bohlool BB. Modeling symbiotic performance of introduced rhizobia in the field by use of indices of indigenous population size and nitrogen status of the soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991;57(1):29-37.
12. Sosa A, Elías A, García OA, Sarmiento M. Aislamiento y caracterización fenotípica parcial de cepas de rizobios que nodulan leguminosas rastreras. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 2004;38(2):197-201.
13. Rennie RJ. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Canadian Journal of Microbiology*. 1981;27(1):8-14.
14. Baldani JI, Pot B, Kirchhof G, Falsen E, Baldani VLD, Olivares FL, et al. Emended description of *Herbaspirillum*; incusion of *Pseudomonas rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. Nov.; and classification of a Group of Clinical Isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1996;46(3):802-10.
15. Nápoles MC, Martínez J, Costales D, Morales B, Martínez E, Rogel MA. Avances en la reidentificación de la cepa ICA 8001 *Bradyrhizobium japonicum* como perteneciente a *Bradyrhizobium elkanii*. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*. 2011;20(1-2):43-6.
16. Ángeles Cumpa AA, Tesén Villanueva JF. Infectividad y efectividad de rizobios en *Lablab purpureus* (L.) Sweet "Frijol chileno". 'Tesis para optar el título profesional de licenciado en biología microbiología -parasitología". 'Lambayeque": Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2019.
17. Singh AK, Nandan R, Singh PK. Genetic variability and association analysis in rice germplasm under rainfed conditions. *Crop Research*. 2015;47(1, 2 & 3):7-11.
18. Zhang X-X, Gao J-S, Cao Y-H, Sheirdil RA, Wang X-C, Zhang L. *Rhizobium oryzicola* sp. nov., potential plant-growth-promoting endophytic bacteria isolated from rice roots. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2015;65(9):2931-6.
19. Lloret L, Martínez-Romero E. Evolución y filogenia de rhizobia. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2005;47(1-2):43-60.
20. Murugesan S, Manoharan C, Vijayakumar R, Panneerselvam A. Isolation and characterization of *Agrobacterium rhizogenes* from the root nodules of some leguminous plants. *Intl J Microbiol Res*. 2010;1:92-6.
21. Whitman WB. Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria. New York, United States of America: Wiley; 2015. 503 p.
22. Young JM, Kuykendall LD, Martinez-Romero E, Kerr A, Sawada H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001;51(1):89-103.
23. Peix A, Ramírez-Bahena MH, Velázquez E, Bedmar EJ. Bacterial associations with legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2015;34(1-3):17-42.
24. Niehus R, Picot A, Oliveira NM, Mitri S, Foster KR. The evolution of siderophore production as a competitive trait. *Evolution*. 2017;71(6):1443-55.
25. Kudoyarova GR, Vysotskaya LB, Arkhipova TN, Kuzmina LY, Galimyanova NF, Sidorova LV, et al. Effect of auxin producing and phosphate solubilizing bacteria on mobility of soil phosphorus, growth rate, and P acquisition by wheat plants. *Acta physiologae plantarum*. 2017;39(11):253.
26. Singh AP, Dixit G, Mishra S, Dwivedi S, Tiwari M, Mallick S, et al. Salicylic acid modulates arsenic toxicity by reducing its root to shoot translocation in rice *Oryza sativa* L. *Frontiers in Plant Science*. 2015;6:1-28. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00340>
27. Largia MJV, Pothiraj G, Shilpha J, Ramesh M. Methyl jasmonate and salicylic acid synergism enhances bacoside A content in shoot cultures of *Bacopa*

- monnierii* (L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2015;122(1):9-20.
28. Quim N, Cerra A, Chamorro L, Pérez A. Resistencia a cadmio (Cd) de bacterias endófitas y bacterias rizosféricas aisladas a partir de *Oriza sativa* en Colombia. Revista Colombiana de Ciencia Animal-REClA. 2017;9(2):281-93.
29. de la Fe Pérez Y, de la Osa AD, Franco GMR, Baldani VL, Rodríguez AH. Diversidad de bacterias diazotróficas asociativas potencialmente eficientes en cultivos de importancia económica/Diversity of associative diazotrophic bacteria and potential use in economic important crops. Revista Cubana de Ciencias Biológicas. 2015;4(1):17-26.
30. López SMY. Análisis de las alteraciones estructurales y/o regulatorias en los genes de nodulación y fijación de nitrógeno, en aislados de *Bradyrhizobium japonicum* que difieren en su capacidad de fijar nitrógeno. 'Tesis Doctoral'. Universidad Nacional de La Plata, Instituto de Fisiología Vegetal; 2015.
31. Bernabeu P. Caracterización de la colonización y promoción del crecimiento vegetal por *Burkholderia tropica* en gramíneas 'Tesis para optar al grado Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas'. Universidad Nacional de La Plata, Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI-CONICET-CCT La Plata); 2017.