

EFECTO PROMOTOR DEL CRECIMIENTO VEGETAL DE CEPAS DE *Azospirillum sp.* EN EL CULTIVO DEL ARROZ

Yanelis Acebo✉, Narovis Rives, Mayra Heydrich y Annia Hernández

ABSTRACT. Rice is one of the most important food supplies worldwide. As a sustainable agriculture strategy, to increase yield and substitute chemical fertilizers, bacteria-based biofertilizers are now used. The genus *Azospirillum* has been proved to promote plant growth, due to its ability to produce plant growth regulators such as auxins and fix atmospheric nitrogen. Several *Azospirillum* strains were selected to test their capability to produce auxins by Salkowski's method and fix atmospheric nitrogen by the acetylene reduction assay. Positive results were achieved; the strains produced auxins ($2.75\text{-}8.6\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and were capable of fixing atmospheric nitrogen ($164.17\text{-}384.9\ \text{nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot 5\ \text{mL}^{-1}$). An *in vitro* bioassay was carried out to assess plant-growth-promotion ability of strains in rice, with positive results as well. High increases referring to control treatment were obtained.

RESUMEN. El arroz es fuente de alimento y empleo para una gran parte de la población mundial. Como parte de la estrategia de agricultura sostenible para aumentar el rendimiento y sustituir los fertilizantes químicos, son utilizados actualmente inoculantes microbianos elaborados a partir de rizobacterias. En particular, el género *Azospirillum* ha sido utilizado como agente promotor del crecimiento vegetal, debido a su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico y producir auxinas del tipo ácido indolacético. Se emplearon cepas nativas aisladas y de referencia, a las que se les determinó su capacidad de producir compuestos indólicos mediante la técnica colorimétrica derivada de Salkowski y la capacidad de fijación de nitrógeno, mediante el ensayo de reducción de acetileno. Se obtuvieron resultados positivos para todas las cepas, que resultaron productoras de compuestos indólicos en un rango de $2.75\text{-}8.6\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y con una capacidad de fijar nitrógeno de $164.17\text{-}384.9\ \text{nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot 5\ \text{mL}^{-1}$. Se llevó a cabo además un bioensayo destinado a evaluar la aplicación de estas cepas, como agentes promotores del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (variedad J-104). Se obtuvo un incremento notable en los parámetros de crecimiento de la planta con respecto al control.

Key words: *Azospirillum*, IAA, nitrogen fixation, plant growth substances

Palabras clave: *Azospirillum*, AIA, fijación del nitrógeno, sustancias de crecimiento vegetal

INTRODUCCIÓN

Los cereales constituyen la base de la alimentación humana, destacándose el arroz como el alimento primario de más de la mitad de la población mundial (1).

La aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) en cultivos de importancia agrícola, es una alternativa viable, sobre todo en los países con una agricultura subdesarrollada, que carecen de fertilizantes (2, 3, 4).

La capacidad para producir fitohormonas como el ácido 3-indolacético (AIA) está ampliamente distribuida entre las PGPB, siendo su detección y cuantificación un paso vital en la caracterización de las cepas, empleán-

dose para ello técnicas fisicoquímicas e inorgánicas (5, 6). Entre los géneros más destacados en la producción de esta fitohormona se encuentran *Azospirillum* y *Herbaspirillum* (7).

Un mecanismo que explica también el aumento en los cultivos es la capacidad de estos géneros bacterianos para fijar el nitrógeno atmosférico, ya que luego del agua, el nitrógeno es el factor limitante más importante para el desarrollo de las plantas (8). Una técnica empleada frecuentemente en la cuantificación de la actividad enzimática de la nitrogenasa es el ensayo de reducción de acetileno (ARA), que resulta sencillo y tiene una sensibilidad adecuada (9).

El objetivo del presente trabajo es hacer una caracterización en cuanto a la producción de auxinas y la capacidad para fijar nitrógeno atmosférico de cepas nativas de *Azospirillum sp.* asociadas al cultivo del arroz, así como la evaluación del efecto que ejerce su inoculación *in vitro* en plantas de arroz (*Oryza sativa*) var. J-104.

Yanelis Acebo, Especialista; Dra.C. Mayra Heydrich, Profesora Auxiliar y Dra.C. Annia Hernández, Profesora Asistente del Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana; Narovis Rives, Investigadora del Departamento de Protección de Plantas, Instituto de Investigaciones del Arroz, km 16½ Autopista Novia del Mediodía, Bauta, La Habana, Cuba.

✉ acebo@fbio.uh.cu

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos microbianos. En los diferentes experimentos se utilizaron cepas endófitas aisladas de plantas de arroz (*Oryza sativa*) var. J-104, pertenecientes al género *Azospirillum* (AA7, AA9, AA17, AA20, AA21, AA24, AA25, AA27), identificadas previamente por Rives *et al.* (10) y depositadas en la colección de cultivos del Laboratorio de Ecología Microbiana de la Facultad de Biología. Se emplearon, además, las cepas patrones *Azospirillum brasilense* 245 y *A. brasilense* 81, procedentes de EMBRAPA (Brasil), donadas gentilmente por el Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA).

Producción de AIA. Para la determinación cuantitativa de los compuestos indólicos de tipo AIA, se siguió la técnica descrita por Hernández (11), utilizando como revelador el reactivo de Salkowski.

Cuantificación de la actividad nitrogenasa (ARA). Se siguió la metodología descrita por Elbeltagy *et al.* (12), utilizando como medio semisólido libre de nitrógeno el Nfb (13). Los resultados fueron medidos en un cromatógrafo de gases CHROM 5 con un detector de ionización de llama acoplado a un ordenador. El resultado de la medición proporciona los datos, para calcular la actividad enzimática del complejo nitrogenasa con ayuda de una curva patrón.

Ensayo de interacción planta-bacteria en el cultivo del arroz var. J-104. Se utilizó el modelo de tubos espermosféricos (14) para probar el efecto de la inoculación de las cepas de *Azospirillum* en plantas de arroz (*Oryza sativa* J-104). La inoculación se hizo en semillas y el efecto se evaluó a los 21 días luego de la emergencia. Los parámetros de promoción del crecimiento vegetal evaluados fueron los siguientes: masas fresca y seca de raíces y tallo, longitud de las raíces y altura de las plántulas.

Para este estudio se pregerminaron semillas en cámaras húmedas. Las semillas germinadas se trasladaron a tubos de cultivos de 20x3 cm, a razón de dos semillas por tubo, que contenían 20 mL de medio MS (15).

Para la inoculación de las semillas, se añadieron 2 mL de una suspensión bacteriana de concentración celular de 10^8 cel. mL⁻¹ a cada tubo de cultivo, usando como control negativo la inoculación de 2 mL por tubo de agua destilada estéril. Se establecieron 10 tubos por tratamiento (20 plantas), repitiendo el bioensayo dos veces.

La incubación transcurrió a temperatura ambiente en régimen de 14 horas de luz y 10 horas oscuridad. Al cabo de 21 días, las plantas se removieron de los tubos con mucho cuidado, se lavaron con agua destilada, se secaron con papel de filtro y se procedió a separar la sección aérea de la raíz, a fin de determinar los diferentes parámetros de crecimiento.

Se midió el largo de la raíz principal y el tallo, utilizando una regla milimétrica como instrumento de medición. Para determinar la masas fresca y seca, tanto de la raíz como del tallo de las plántulas, se utilizó una balan-

za analítica (Sartorius). La determinación de la masa fresca se hizo luego de la medición de la altura del tallo y el largo de las raíces, y la masa seca se determinó luego de secar completamente el material vegetal en un horno (Memmert, Bélgica) a 70°C durante tres días.

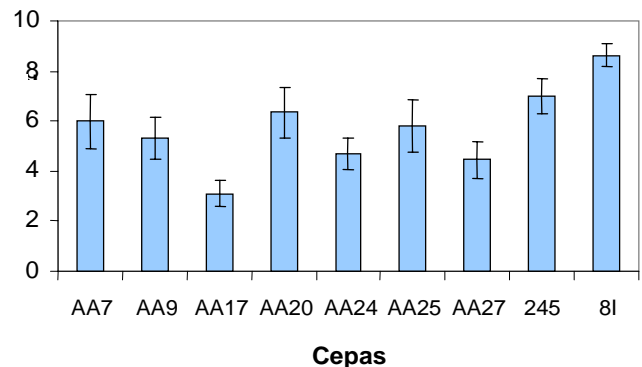
Análisis biométricos. De forma preliminar, a todas las variables se les realizó la prueba de normalidad de Shapiro y Wilk y homogeneidad de varianzas, contenidas en el paquete estadístico Statistica 5.0. A partir de estos resultados, se decidió realizar los análisis paramétricos y no paramétricos según correspondiera.

Los bioensayos presentaron distribución normal y se realizó la prueba de Student-Newman-Keuls (SNK) paramétrica. Todas las pruebas estadísticas realizadas están contenidas en el paquete estadístico Statistica 5.0.

RESULTADOS

Producción de AIA. Se determinó que todas las cepas seleccionadas producen compuestos indólicos con actividad auxínica del tipo AIA. Estos resultados coinciden con otros planteamientos que indican la producción de estos metabolitos por bacterias con actividad promotora del crecimiento vegetal. En este sentido, Munir *et al.* (16), Barea *et al.* (17) y Nelson (18) indicaron que la síntesis de AIA en cepas de *Azospirillum* es uno de los mecanismos de acción responsable de los efectos beneficiosos obtenidos al inocular plantas con esta bacteria. La Figura 1 corresponde a los resultados obtenidos.

Concentración de compuestos indólicos de tipo AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)



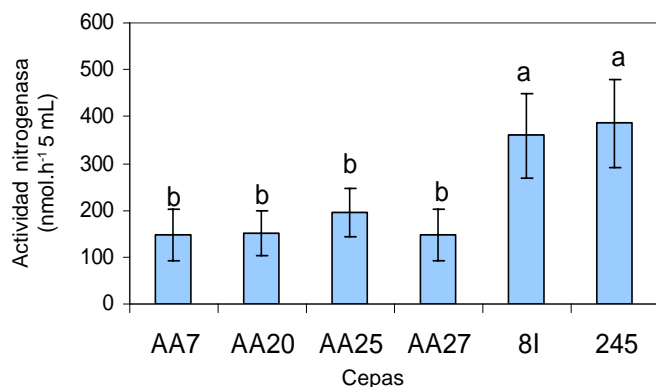
Las letras no comunes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) según la prueba SNK paramétrica

Figura 1. Concentración de compuestos indólicos de tipo AIA producidos por las cepas seleccionadas de *Azospirillum* y las cepas patrones

Los niveles de producción de AIA son bajos si se comparan con los informados para este mismo género (19, 20, 21). Este comportamiento podría estar relacionado con la concentración de triptófano adicionada al medio, como precursor de la síntesis de este metabolito. En este sentido, Zakharova *et al.* (5) señalaron que concentraciones de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de triptófano en el medio, favorecen de forma óptima la mayor producción de AIA de

Azospirillum brasilense, observándose cierta inhibición en algunas cepas al utilizar concentraciones mayores, que normalmente son empleadas para estos fines (en este estudio, $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Este fenómeno parece ser dependiente de la cepa, ya que otros no han referido dicha inhibición (20, 21).

Cuantificación de la actividad nitrogenasa (ARA). Se encontraron diferencias significativas en la actividad enzimática nitrogenasa entre las cepas. *A. brasilense* 245 y *A. brasilense* 8I se destacaron por los valores de la actividad nitrogenasa. En orden descendente, le siguen las cepas AA25, AA27, AA20 y AA7, que no presentan diferencias significativas entre sí (Figura 2).



Las letras no comunes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) según la prueba SNK paramétrica

Figura 2. Valores de actividad nitrogenasa ($\text{nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot 5 \text{ mL}^{-1}$) de las cepas seleccionadas de *Azospirillum*

De forma general, los valores encontrados para la actividad nitrogenasa en el género *Azospirillum* son elevados, lo que se corresponde con otros resultados informados (22, 23, 24). Es importante destacar que el mecanismo de fijación biológica de nitrógeno atmosférico ha sido muy utilizado, para explicar los efectos beneficiosos obtenidos en plantas de interés agrícola mediante la inoculación con cepas de este género (25, 26, 27).

Ensayo de interacción planta-bacteria en el cultivo del arroz var. J-104. En la Tabla I se muestran los resultados de los bioensayos de promoción del crecimiento.

De modo general, la mayor capacidad para promover el crecimiento vegetal fue alcanzada por las cepas de *Azospirillum sp.* AA7 y AA20, que ocuparon los primeros lugares en los parámetros evaluados, destacándose también por alcanzar altos niveles en la producción de auxinas. Mantelin y Touraine (28) señalaron la importancia de este mecanismo en el desarrollo del sistema radical del cultivo, y la toma de nitrato y otros nutrientes por la planta.

Asimismo, la fijación biológica de nitrógeno en microorganismos de vida libre asociados a gramíneas, constituye un mecanismo importante de promoción del crecimiento (9), aunque es necesario tener en cuenta la interacción planta-microorganismo, para describir con mayor exactitud el efecto beneficioso en cada caso particular (12). Esto se pone de manifiesto en el presente trabajo, ya que aunque 8I y 245 fueron las cepas de referencia que mostraron los mayores valores de fijación de nitrógeno, seguidas por AA25, AA7 y AA20, estas no fueron las de mayor efecto promotor del crecimiento vegetal. En este sentido, Persello-Cartieaux *et al.* (29), Ping y Boland (30) y Bashan y de-Bashan (20) señalaron que conocer el comportamiento de las especies microbianas ante los exudados radicales de las plantas, constituye un principio básico de la interacción planta-microorganismo. Asimismo, Hernández *et al.* (31) señalaron la acción selectiva de los exudados radicales ante los grupos microbianos presentes en la rizosfera, pudiendo manifestarse un comportamiento diferenciado según la especie vegetal, la cepa microbiana, la edad vegetal e incluso la variedad de la planta. En el presente trabajo, se aislaron cepas potencialmente eficientes en la promoción del crecimiento en el cultivo del arroz, aunque se considera necesario continuar los estudios en macetas y campo, para confirmar los efectos beneficiosos observados.

Tabla I. Mediciones de los parámetros de crecimiento vegetal. Tratamientos: control sin inocular, cepas de *Azospirillum sp.* y cepas patrones

Tratamientos	Parámetros de crecimiento					
	Masa fresca (mg)		Masa seca (mg)		Longitud (cm)	
	Raíz	Tallo	Raíz	Tallo	Raíz	Tallo
AA25	69,78±6,38 c	74,57±7,36 b	14,14±0,36 b	10,64±1,59 ab	9,78±0,45 a	31,30±0,76 c
AA20	81,42±8,95 ab	68,64±4,97 c	13,93±1,18 bc	9,93±1,61 b	9,68±0,63 a	33,23±0,91 a
AA7	84,40±6,18 a	74,90±7,64 b	15,42±0,85 a	12,07±1,54 a	9,47±0,65 a	33,73±0,99 a
AA9	75,84±6,22 bc	75,57±5,72 b	14,27±1,06 b	10,71±1,13 ab	9,97±0,62 a	31,10±0,57 c
8I	77,68±6,85 b	84,07±5,31 a	13,35±0,74 cd	9,50±1,16 b	4,80±0,38 d	30,90±0,65 c
245	72,19±6,61 bc	72,38±5,71 bc	14,21±0,69 b	11,57±2,10 a	8,41±0,47 b	32,14±1,05 b
Control	69,33±3,84 c	67,54±5,24 c	13,07±0,82 d	7,28±0,82 c	6,18±0,60 c	25,27±0,66 d

REFERENCIAS

1. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) FAO production yearbook, Roma, 2004.
2. Pereira-Stamford, N.; Ribeiro dos Santos, P.; Muniz-Mendes Freire de Moura, A.; Etienne de Rosália e Silva Santos, C. y Santiago de Freitas, A. N. Biofertilizers with natural phosphate, sulphur and *Acidithiobacillus* in a soil with low available-P. *Scientia Agricola*, 2003, vol. 60, p. 767-773.
3. Matiru, V. N. y Dakora, F. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. *African Journal of Biotechnology*, 2004, vol. 3, p. 1-7.
4. Dalla-Santa, O. R.; Fernández-Hernández, R.; Michelena-Alvarez, G. L.; Ronzelli-Junior, P. y Zoclo, C. R. *Azospirillum* sp. Inoculation in wheat, barley and oat seeds greenhouse experiments. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2004, vol. 47, p. 843-850.
5. Zakharova, E. A.; Shcherbakov, A. A.; Brudnik, V. V.; Skripko, N. G.; Bulkin, N. Sh. e Ignatov, V. V. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*: insights from quantum chemistry. *Eur. J. Biochem.* 1999, vol. 259, p. 572-576.
6. Kowalczyk, M. y Sandberg, G. Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 2001, vol. 127, p.1845-1853.
7. Radwan, T.; Mohamed, Z. K. y Reis, V. M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. *Pesq. Agropec. Bras., Brasília*, 2004, vol. 39, no. 10, p. 987-994.
8. Amir, H. G.; Shamsuddin, Z. H.; Halimi, M. S.; Ramlan, M. F. y Marziah, M. N₂ fixation, nutrient accumulation and plant growth promotion by rhizobacteria in association with oil palm seedlings. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2003, vol. 6, p. 1269-1272.
9. Campillo, R.; Urquiaga, S.; Pino, I. y Montenegro, A. Estimación de la fijación biológica de nitrógeno en leguminosas forrajeras mediante la metodología del ¹⁵N. *Agricultura Técnica*, 2003, vol. 63, no. 2.
10. Rives, N.; Hernández, A.; Heydrich, M.; Rodríguez, A. J. y Manzano, J. Bacterias asociadas al arroz como una alternativa en la búsqueda de la sustentabilidad agrícola. *Contribución a la Educación y la Protección Ambiental*, 2003, vol. 4, p. 45-51.
11. Hernández, A. Obtención de un bioestimulador del crecimiento vegetal a partir de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz (*Zea mays* L). [Tesis de grado]; Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, 2002.
12. Elbeltagy, A.; Nishioka, K.; Sato, T.; Suzuki, H.; Ye, B.; Hamada, T.; Isawa, T.; Mitsui, H. y Minamisawa, K. Endophytic colonization and in plant nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, vol. 67, p.5285-5293.
13. Baldani, J. I.; Pot, B.; Kirchof, G.; Falsen, E.; Baldani, V. L. D.; Olivares, F. L.; Hoste, B.; Kersters, K.; Hartmann, A.; Gillis, M. y Döbereiner, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF Group 1) as species 3. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1996, vol. 46, p. 802-810.
14. Kabir, M.; Faure, D.; Heulin, T.; Achoawk, W. y Bally, R. Oligonucleotide probes based on 16S rRNA sequences for the identification of four *Azospirillum* species. *Can. J. Microbiol.*, 1995, vol. 41, p. 1081-1087.
15. Murashige, T. y Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, 1962, vol. 15, p. 473-497.
16. Munir A., Munir I., Afrasyab S., Hasnain S. Growth stimulatory effects of *Azospirillum* strains on *Triticum aestivum* and *Vigna radiata*. *Biotechnology*, 2003, vol. 2, p. 198-205.
17. Barea, J. M.; Pozo, M. J.; Azcón, R. y Azcón-Aguilar, C. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 2005, vol. 56, no. 417, p. 1761-1778.
18. Nelson, L. M. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants. *Crop Management*, 2004.
19. Ona, O.; Van Impe, J.; Prinsen, E. y Vanderleyden, J. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, vol. 246, p. 125-132.
20. Bashan, Y.; de-Bashan, L. E. Bacteria. En: Encyclopedia of soils in the environment, Oxford, Elsevier, U.K. 2005. t 1, p. 103-115.
21. Rodríguez, H.; Mendoza, A.; Cruz, M. A.; Holguin, G.; Glick, B. R. y Bashan, Y. Pleiotropic physiological effects in the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* following chromosomal labeling in the *trpX* gene. *FEMS Microbiol Ecol*, 2006, vol. 57, p. 217-225.
22. Kennedy, I. R.; Choudhury, A. T. M. A. y Kecskés, M. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, vol. 36, p. 1229-1244.
23. Tejera, N.; Lluch, C.; Martínez-Toledo, M. V. y González-López, J. Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant and Soil*, 2005, vol. 270, p. 223-232.
24. Tejera, N.; Ortega, E.; Rodes, R. y Lluch, C. Nitrogen compounds in the apoplastic sap of sugarcane stem: Some implications in the association with endophytes. *Journal of Plant Physiology*, 2006, vol. 163, p. 80-85.
25. Bacilio, M.; Vazquez, P. y Bashan, Y. Alleviation of noxious effects of cattle ranch composts on wheat seed germination by inoculation with *Azospirillum* spp. *Biol Fertil Soils*, 2003, vol. 38, p. 261-266.
26. Bashan, Y.; Holguin, G. y de-Bashan, L. E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.*, 2004, vol. 50, p. 521-577.
27. Huergo, L. F.; Filipaki A.; Chubatsu, L. S.; Geoffrey-Yates, M.; Steffens, M. B.; Pedrosa, F. O. y Souza, E. M. Effect of the over-expression of PII and PZ proteins on the nitrogenase activity of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, vol. 253, p. 47-54.
28. Mantelin, S. y Touraine, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *Journal of Experimental Botany*, 2004, vol. 55, no. 394, p. 27-34.
29. Persello-Cartiaux, F.; Nussaume, L. y Robaglia, C. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant, Cell and Environment*, 2003, vol. 26, p. 189-199.
30. Ping, L. y Boland, W. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. *TRENDS in Plant Science*, 2004, vol. 9, p. 263-266.
31. Hernández, A.; Manzano, J.; El Jaziri, M.; Diallo, B. y Heydrich, M. Determinación de la factibilidad biológica del biopreparado RIZOBAC® en el cultivo del arroz (*Oryza sativa*) CD-ROM. En: Memorias Encuentro Internacional del Arroz, (3:2005 jun. 6-10:La Habana), 2005.

Recibido: 9 de marzo de 2007

Aceptado: 4 de octubre de 2007