

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Effect of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) associated to *Pennisetum clandestinum* in the altiplano cundiboyacensePaola Jimena Criollo¹, Melissa Obando¹,
Leonardo Sánchez M.¹, Ruth Bonilla¹

A B S T R A C T

Pennisetum clandestinum (kikuyo) is a common pasture in the altiplano cundiboyacense silvopastoral systems, which possesses high nutritional value. Therefore, studies to improve the production process in both economic and environmental terms are very important. The role of inoculation with plant growth-promoting bacteria was evaluated on the growth of kikuyu grass. The 4K and 5B strains were identified, through amplification and analysis of their 16S rDNA, as members of the *Stenotrophomonas* and *Pseudomonas* genera, respectively. They were characterized *in vitro* for their efficiency of biological nitrogen fixation, production of indole compounds, and phosphate solubilization. Four treatments were evaluated under greenhouse conditions.

Furthermore, the biomass was evaluated at different stages of the plant (70, 100 and 130 days). The 4K strain demonstrated a root dry weight that increased by 50% at 70 and 100 days and the 5B strain showed a statistically significant behavior for plant and root dry weight with an increase of 50% at 130 days. The most important effect was presented after 100 d where treatments, TQ, TB1 and TB2, exceeded more 80% to absolute control in the fresh weight of the air. These results showed that inoculation with PGPR represents a biotechnological alternative to promote growth of *P. clandestinum*, as we observed relevant effects on biomass production 100 days after planting.

Key words: silvopastoral system, grasses, biological nitrogen fixation, indolic compounds, phosphate solubilization

R E S U M E N

Pennisetum clandestinum (kikuyo) es una pastura común en los sistemas silvopastoriles del altiplano cundiboyacense, con altas propiedades nutritivas. Por tanto estudios que permitan mejorar el proceso de producción en términos económicos y ambientales reviste gran importancia. En este estudio se evaluó el papel de la inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) sobre el crecimiento de pasto kikuyo. Las cepas 4K y 5B fueron identificadas mediante amplificación y análisis del 16S rADN, como *Stenotrophomonas* ssp. y *Pseudomonas* ssp., respectivamente, caracterizadas por su eficiencia *in vitro* en la fijación biológica de nitrógeno, producción de compuestos indólicos y solubilización de fosfatos. Se evaluaron las cepas en condiciones de invernadero en tres tiempos de crecimiento de la planta (70, 100 y 130 días). Se evidenció que la cepa 4K incrementó el peso seco radicular de la planta en 50% a los 70 y 100 días, mientras que la cepa 5B mostró un comportamiento similar en el peso seco aéreo y radicular con aumentos de hasta el 50% a los 130 d. El efecto más importante se presentó después de 100 d donde los tratamientos TQ, TB1 y TB2, superaron en más del 80% al testigo absoluto en el peso fresco de la parte aérea. Estos resultados demostraron que la inoculación de PGPR representa una alternativa biotecnológica para promover el crecimiento de *P. clandestinum*, con efectos relevantes en producción de biomasa 100 días después de la siembra (dds).

Palabras clave: sistemas silvopastoriles, gramíneas, fijación biológica de nitrógeno, compuestos indólicos, solubilización de fosfato

I N T R O D U C C I Ó N

En Colombia, *Pennisetum clandestinum* Hochst. ex Chiov (Kikuyo) es una pastura común en muchos ambientes y se asocia principalmente a los sistemas silvopastoriles en el altiplano cundiboyacense con diferentes especies arbóreas. Debido a su rápida tasa de crecimiento se utiliza para la alimentación de ganado, además es un pasto apetecible y altamente digerible, con alto valor proteico, bajo conte-

Fecha de recepción: 02-03-2012
Fecha de aceptación: 22-10-2012

¹ Centro de Investigación Tibaitatá, Corporación de Investigación Agropecuaria (Corpoica). Mosquera (Colombia). pcriollo@corpoica.org.co

nido de fibra y altas propiedades nutritivas (Marais *et al.*, 1992), también se emplea en la recuperación de suelos degradados en ambientes fríos, para el control de la erosión, aplicados como cobertura del suelo. Numerosos reportes indican que *P. clandestinum* es tolerante al estrés abiótico como la salinidad, la sequía, el anegamiento y la acidez del suelo (Sidari *et al.*, 2004).

El suelo es un ecosistema con una gran variedad y cantidad de microorganismos benéficos. La fracción del suelo donde influye la proliferación de estos microorganismos por la presencia del sistema de raíces de las plantas se le conoce como rizósfera (Cassán *et al.*, 2009). Las diferentes poblaciones bacterianas presentes en la rizósfera, se llaman rizobacterias o bacterias promotoras de crecimiento vegetal - PGPR (por su siglas en inglés *Plant growth-promoting rhizobacteria*) y poseen la capacidad de colonizar el sistema radicular de las plantas o su entorno más cercano; clasificándose en tres grupos principales, las que pueden colonizar el tejido de la planta formando nódulos (simbióticas), las que se hospedan en estructuras internas de la planta (endofíticas) y las que se encuentran cerca del sistema radicular de la planta (bacterias de vida libre) (Klopper *et al.*, 1989).

Múltiples estudios han publicado que las PGPR se asocian con cultivos importantes tales como *Oryza sativa*, *Triticum* spp., *Sorghum* spp, *Sacharum officinarum*, *Zea mays* (Okon, 2005; James, 2000; Andrews *et al.*, 2003; Berg, 2009) y pasturas (Lugtenberg y Kamilova, 2009). Dentro de las PGPR más referenciadas son *Azospirillum* sp., *Bacillus* sp., *Rhizobium* sp., *Burkholderia* sp., *Enterobacter* sp., *Azotobacter* sp., *Erwinia* sp., *Herbaspirillum* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp. y *Xanthomonas* sp. (Cassán *et al.*, 2009; Bashan *et al.*, 2012).

Inoculaciones de PGPR en cultivos de interés agronómico han demostrado el aumento del nitrógeno, fósforo y los niveles de algunos minerales menores que se hacen disponibles para la planta (Bashan y Holguín, 1997; Egamberdieva *et al.*, 2004). Una amplia variedad se ha encontrado que estimula mediante diversos mecanismos el desarrollo de numerosas gramíneas. El objetivo de esta investigación fue determinar de forma preliminar el efecto de la inoculación de *Stenotrophomonas* y *Pseudomonas* (PGPR) en la promoción del crecimiento de *P. clandestinum* en tres etapas de desarrollo de la planta bajo condiciones de invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y condiciones de crecimiento

Los microorganismos autóctonos de sistemas silvopastorales previamente aislados se preservaron en el Banco de

Trabajo del Laboratorio de Microbiología del CBB (Centro de Biotecnología y Bioindustria) - Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). Para el presente trabajo se utilizaron las cepas 4K y 5B. Las cepas fueron crecidas en medio de cultivo Luria Bertani (LB) (Bertani, 1952; Bertani, 2004) durante 24 h y se agitaron a 120 rpm a 30°C para procedimientos posteriores. Los controles de calidad presentaron 100% de pureza y la concentración celular de 10⁸ ufc/mL.

Identificación molecular por secuenciación parcial de 16S rDNA

El ADN bacteriano fue extraído mediante el uso de DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Alemania) según las instrucciones del fabricante. El ADN genómico extraído se diluyó en agua estéril Milli-Q antes de llevar a cabo el análisis de PCR bajo las siguientes condiciones: 25 mL de mezcla de PCR que contenía 1X Taq DNA polimerasa tampón (Invitrogen, USA), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de trifosfato de desoxinucleósido, 25 pmol de primer (forward-reverse), 1 U de ADN polimerasa (Invitrogen, USA), y 1 µL del extracto diluido de ADN como molde. Casi genes completos del 16S rADN fueron amplificados con cebador forward 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y el cebador reward 1492R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'). El ADN se amplificó con un termociclador iCycler (BioRad, USA) con el siguiente programa: 4 min de precalentamiento a 95°C, 35 ciclos de 30 s de desnaturalización a 95°C, 30 s de hibridación del cebador a 57°C, 2 min de elongación a 72°C, y 10 min de paso de extensión a 72°C. Cada mezcla de amplificación (5 µL) se analizó por gel de agarosa (1,5% w/v) de tampón de electroforesis TAE (0,04 M Tris-acetato, 0,001 M EDTA) que contenía 20 µg mL⁻¹ (w/v) de bromuro de etidio. El ADN amplificado fue purificado utilizando el PureLink™ kit de gel extracción rápida (Invitrogen, USA) según las instrucciones del fabricante. La secuenciación automatizada de los productos de PCR purificado se realizó utilizando el kit de secuenciación BigDye Terminator y el secuenciador de ADN ABI 310 (Applied Biosystems, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las secuencias parciales obtenidas fueron comparadas con las secuencias de nucleótidos presentes en el GenBank utilizando el programa BLAST (Altschul *et al.* 1990) y las quimeras fueron detectadas utilizando el programa PINTAIL (Ashelford *et al.*, 2005).

Caracterización de las capacidades bacterianas de promoción de crecimiento vegetal in vitro

Fijación biológica de nitrógeno. La actividad nitrogenasa se realizó por medio del ensayo de reducción de acetileno en tubos de ensayo de 10 mL, conteniendo 5 mL de medio Ashby semisólido (libre de nitrógeno). Después se

agregaron 50 µL de suspensión bacteriana y se incubaron a 30°C por 48 h. Posteriormente, se sustituyó el 10% de la atmósfera por acetileno durante 1 h. La fijación biológica de nitrógeno fue cuantificada mediante cromatografía de gases (Perkin Elmer, USA) con detector de ionización de llama y una columna Poropak N 200/300 mesh de 6 pies y 3 mm de diámetro (Eckert *et al.*, 2001).

Producción de hormonas indólicas. A partir de la fermentación líquida en medio K - Lactato suplementado con triptofano (100 µg mL⁻¹), se tomaron 4 mL de cultivo, se centrifugaron a 7378 G 10 min, se tomó 1 mL del sobrenadante y se llevó a reacción con 1 mL del reactivo de Salkowsky modificado. La reacción se incubó por 30 min en completa oscuridad por triplicado. Una vez pasado el tiempo de reacción, se determinó la absorbancia de cada tubo en un espectrofotómetro a 540 nm. Con los datos de absorbancia se obtuvo el promedio de las réplicas y se reemplazaron los datos en la ecuación de la recta de la curva patrón para determinar la producción de indoles totales (Carreño *et al.*, 2000).

Solubilización de fosfato. El método cuantitativo de fosfomolibdato fue empleado para determinar el fosfato disponible. Para esto, cada cepa fue crecida en medio SRS (Sundara y Sinha, 1963) sin indicador e incubada por 120 h /150 rpm. Posteriormente, se tomó 1 mL de alícuota de cada erlenmeyer, incluyendo los controles y se centrifugaron a 7378 G 10 min y finalmente 500 µL del sobrenadante se emplearon para el análisis (Fiske y Subbarow, 1925).

Ensayo en invernadero

El suelo y el material vegetal se obtuvieron de Corpoica, Centro de Investigación Tibaitatá, Mosquera (Cundinamarca). Fueron utilizadas bolsas de plástico con capacidad de 3 kg con 2,5 kg de suelo. Los estolones de *P. clandestinum* fueron seleccionados y desinfectados con etanol al 70% en 5 min y luego con solución de hipoclorito de sodio 3% a 5 min. Para este estudio, el suelo fue fertilizado de acuerdo al análisis de suelo, con nitrógeno (100 kg ha⁻¹ en forma de urea) en los tratamientos que lo requerían. El análisis del suelo utilizado se describe a continuación (Tabla 1).

Se implementaron cuatro tratamientos para evaluar la respuesta de *P. clandestinum* a la inoculación de dos cepas

con capacidad de promoción de crecimiento vegetal. Los tratamientos fueron los siguientes: TA: testigo absoluto, TQ: control químico, TB1: inoculación con la cepa 4K + 50% de la dosis de nitrógeno (en forma de urea) y TB2: inoculación con la cepa 5B + 50% de la dosis de nitrógeno. Los muestreos se realizaron a los 70, 100 y 130 días después de la siembra (dds) y las variables evaluadas fueron longitud aérea, peso fresco y seco de la parte aérea y radicular. Así mismo, se determinó el contenido de nitrógeno y fósforo total en el tejido vegetal a los 130 dds mediante el método Kjeldahl (Norma AOAC 988.05) y Bray II respectivamente (Bray y Kurtz, 1945).

Diseño y análisis estadístico

Para el diseño, se establecieron cuatro tratamientos con 12 réplicas mediante bloques completos al azar. Los datos fueron analizados utilizando el análisis de varianza ANOVA y Tukey HSD ($P \leq 0,05$) empleando el software estadístico SPSS® 17.0 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación molecular de las cepas 4K y 5B

El análisis comparativo de las secuencias obtenidas con las registradas en la base de datos del NCBI mostró que la cepa 4K se acercó a un porcentaje del 98% de identidad con la secuencia de *Stenotrophomonas* sp. bA22 (JF772548.1) y la cepa 5B presentó un porcentaje del 97% de identidad con la secuencia de *Pseudomonas* sp. KVS86 (HQ591435.1). Las Gamaproteobacterias estuvieron representadas en este estudio por el orden de las Xanthomonadales y Pseudomonadales con la cepa 4K (pertenecientes al género *Stenotrophomonas*) y 5B (pertenecientes al género *Pseudomonas*) identificadas mediante la amplificación del 16S rDNA.

Las especies del género *Pseudomonas* se han reportado ampliamente como PGPR de diversas plantas incluyendo gramíneas (Doty *et al.*, 2009; Okon, 2005; Andrews *et al.*, 2003). Con respecto a *Stenotrophomonas* sp., algunas especies han sido identificadas como patógenas humanas. Sin embargo, ésta especie ha sido aislada de plantas sanas y descrita como una bacteria promotora de crecimiento de varios cultivos de importancia agro-nómica (Idris *et al.*, 2009).

Tabla 1. Análisis químico del suelo del altiplano cundiboyacense

P (mg kg ⁻¹)	S	Ca	Mg	K	Na (cmol ₍₊₎ kg ⁻¹)	Fe	Cu	Mn	Zn	B	Materia orgánica	pH
68,3	50,1	10,6	4,32	0,62	0,65	736	5,9	25,6	29,8	0,32	6,4	5,3

Caracterización de las capacidades bacterianas de promoción de crecimiento vegetal *in vitro*

Las dos cepas en estudio son capaces de producir indoles, fijar nitrógeno y son eficientes en la solubilización de fosfato. La descripción de las capacidades de las cepas 4K y 5B se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Caracterización de las capacidades bacterianas de promoción de crecimiento vegetal *in vitro* de las cepas 4K y B5

Cepa	Solubilización de fósforo ($\mu\text{g} (\text{PO}_4)^3 \text{ mL}^{-1}$)	Producción de indoles ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Fijación de nitrógeno ($\text{nmol C}_2\text{H}_2 \text{ mL h}^{-1}$)
4K	68,10 \pm 0,22 b	0,72 \pm 0,009 b	184,47 \pm 3,29 a
5B	96,01 \pm 0,03 a	1,15 \pm 0 a	183,42 \pm 6,15 a

Medias en la misma columna con la misma letra no presentan diferencias significativas, según la prueba de Tukey HSD ($P \leq 0,05$). Las variaciones corresponden a desviación estándar.

La producción de hormonas indólicas tipo AIA, y sus efectos beneficiosos sobre la promoción del crecimiento vegetal han sido ampliamente estudiados (Sevilla *et al.*, 2001; Shokri y Emtiazi, 2010; Obando *et al.*, 2010). Además, la capacidad de solubilización de fosfato desempeña un papel fundamental en la interacción planta-microorganismo, por la disponibilidad de nutrientes poco móviles, así como en el control biológico sobre patógenos (Rodríguez y Fraga, 1999; Vassilev *et al.*, 2006; Shokri y Emtiazi, 2010).

Los resultados obtenidos con la inoculación de la cepa 5B presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) con respecto a la cepa 4K en cuanto a la capacidad de solubilización de fósforo y producción de indoles. Por otro lado, no se presentaron diferencias en la prueba de fijación de nitrógeno. No obstante, las dos cepas son eficientes en ésta capacidad de acuerdo a lo reportado por Chowdhury *et al.* (2011), quienes encontraron que *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas pseudoalkaligenes* tienen capacidad de reducir acetileno en el orden de 18 y 11,2 nmol de C_2H_2 , lo cual se evidencia en este estudio con las cepas 4K y 5B, las cuales son eficientemente superiores en relación a previos resultados referenciados (Mehnaz y Lazarovits, 2006; Eckert *et al.*, 2001; Carcaño-Montiel *et al.*, 2006; Cárdenas *et al.*, 2010).

Diversos reportes evidencian la variabilidad de las capacidades de promoción de *Stenotrophomonas* sp. y *Pseudomonas* sp., como lo mencionan Taulé *et al.* (2011), quienes obtuvieron nueve cepas de *Stenotrophomonas* sp. a partir de *Saccharum officinarum*, con producciones de hormonas indólicas entre 6,9 – 31,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y sólo una cepa (UYSO27) presentó fijación de nitrógeno mediante actividad de reducción de acetileno. Con respecto a *Pseudomonas* sp., obtuvieron 8 cepas con potencial de

promoción de crecimiento *in vitro*, de las cuales, las cepas UYSO14, UYSO19 y UYSO21 presentaron capacidad para fijar nitrógeno y UYSO16, UYSO17, UYSO18 y UYSO21 para producir indoles. De acuerdo a lo anterior, la eficiencia de estos géneros varía de acuerdo al ecotipo y a los factores edafoclimáticos que rigen su habitat y de ahí la importancia de obtener cepas nativas que garanticen su eficiencia en la promoción de crecimiento mediante diversos posibles mecanismos que actúen allí.

Caracterización de la respuesta del kikuyo a la inoculación con bacterias de promotoras de crecimiento vegetal en invernadero

En la evaluación realizada a los 70 dds, no se presentaron diferencias significativas en peso fresco de parte aérea (PFA) entre los tratamientos TQ y TB1, los mejores valores fueron obtenidos con respecto a TA y TB2. En el peso fresco radical (PFR), el TQ presentó diferencias significativas ($P \leq 0,05$) con respecto a los demás tratamientos evaluados. En cuanto al peso seco en parte aérea (PSA) y radical (PSR), se presentaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) de TQ, seguido de TB2, con respecto a los demás tratamientos evaluados. El tratamiento TB2 mostró un incremento porcentual de 21% en la longitud de la parte aérea (LA) presentando diferencias significativas ($P \leq 0,05$) con respecto a los demás tratamientos.

Los resultados de 100 y 130 dds presentaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) en los tratamientos TB1 y TB2 en todas las variables agronómicas evaluadas respecto al control no inoculado (TA) (Tabla 3). El efecto promotor de crecimiento vegetal de estos tratamientos, se evidenció cuando los valores fueron iguales al tratamiento químico en las variables agronómicas evaluadas. Después de 100 dds, los tratamientos TQ, TB1 y TB2, presentaron valores similares en el peso fresco de la parte aérea, superando en más del 80% al testigo absoluto. Así mismo, TB1 presentó diferencias significativas ($P \leq 0,05$) comparadas con los demás tratamientos analizados para las variables PFR y PSA. En las variables PSR y LA, la respuesta se vio favorecida cuando los tratamientos fueron inoculados con las cepas 4K (TB1) y 5B (TB2), aumentando los valores en más del 50% y 25% respectivamente en comparación con los tratamientos TQ y TA.

Todos los tratamientos bacterianos mostraron un aumento en sus ganancias de biomasa seca en el muestreo de 100 d, pero 30 d después, el control químico elevó sus valores frente a las ganancias de biomasa seca, mostrando que los tratamientos bacterianas tienen efectos significativos en el crecimiento de *P. clandestinum* después de 100 d de inoculación, igualando los valores del tratamiento químico. Además, todos los tratamientos superaron el tratamiento

Tabla 3. Parámetros agronómicos evaluados por tratamiento en pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), en tres épocas diferentes de muestreo

		70 d			100 d			130 d		
		PF (g)	PS (g)	Long (cm)	PF (g)	PS (g)	Long (cm)	PF (g)	PS (g)	Long (cm)
TA	Parte aérea	7,4 ± 0,3 c	1,7 ± 0,2 c	19,17 ± 2,02 c	6,5 ± 0,2 b	2,35 ± 0,15 d	13,83 ± 1,99 c	44,8 ± 5 d	19,35 ± 0,9 c	16,27 ± 1,42 b
	Parte radicular	6,33 ± 0,6 c	0,95 ± 0,15 c	ND	7,1 ± 1,2 c	1,27 ± 0,15 c	ND	22,3 ± 2,8 b	5,47 ± 0,8 c	40,77 ± 5,45 b
TQ	Parte aérea	95,85 ± 0,3 a	20,55 ± 0,15 a	27,6 ± 1,1 b	87,3 ± 13,3 a	24,67 ± 2,96 c	26 ± 1 b	95,9 ± 4,28 c	32,07 ± 1 b	42,8 ± 5,73 a
	Parte radicular	31,6 ± 3,6 a	5,8 ± 0,6 a	ND	13,3 ± 1,93 b	2,67 ± 0,32 b	ND	42,5 ± 5,57 a	10,45 ± 1 a	46,85 ± 4,15 b
4K	Parte aérea	84,25 ± 15 ab	15,67 ± 2,25 ab	28 ± 2 b	90,25 ± 12,35 a	17,15 ± 0,95 b	35,25 ± 1,75 a	71,17 ± 7,78 b	24 ± 1,8 c	19,5 ± 1,95 b
	Parte radicular	21,7 ± 0,4 b	2,1 ± 0,2 b	ND	26,8 ± 1,4 b	3,93 ± 0,49 a	ND	32,9 ± 4,06 ab	7,85 ± 0,4 bc	81,75 ± 9,75 a
5B	Parte aérea	71,13 ± 10 b	17,9 ± 0,9 b	35,25 ± 2,75 a	99,85 ± 6,95 a	32,45 ± 1,55 a	32,5 ± 2,5 a	115,45 ± 9,95 a	42,15 ± 3,4 a	32,87 ± 4,56 a
	Parte radicular	19,65 ± 0,7 b	2,35 ± 0,05 b	ND	14,57 ± 2,3 a	4 ± 0,6 a	ND	27,77 ± 3,45 b	8,8 ± 1,4 ab	55,83 ± 6,37 b

ND: No determinado. ± Desviación estándar. Medias con letras diferentes en la misma columna presenta diferencias significativas, según la prueba de Tukey HSD ($P \leq 0,05$). PF: Peso fresco, PS: Peso seco, Long: Longitud aérea

no inoculado que muestra el efecto de modificar la acumulación de nutrientes y las actividades propias de la planta, que son estimulados significativamente con los tratamientos inoculados y químico, que incidieron en el crecimiento de *P. clandestinum*.

En relación al contenido de nitrógeno y fósforo total en el tejido vegetal no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P \geq 0,05$) a los 130 dds (Datos no mostrados).

Las PGPR, incluyendo las especies de *Pseudomonas* sp. y *Stenotrophomona* sp. identificadas en este estudio, se han reportado ampliamente por su efecto benéfico en diversas plantas incluyendo gramíneas (Doty *et al.*, 2009; Okon, 2005; Andrews *et al.*, 2003; Garrido *et al.*, 2010; Cárdenas *et al.*, 2010). Las variables más influyentes en la evaluación de acumulación de nutrientes y fotoasimilados se refleja en los incrementos de biomasa seca en los tratamientos TB1 y TB2. Mehnaz y Lazarovits (2006), encontraron un aumento de 12% en plantas de maíz inoculadas con *A. lipoferum* N7 con respecto a las plantas no inoculadas. Díaz *et al.* (2009), estudiaron la promoción de crecimiento en plantas de *Eucalyptus globulus*, estimulada por bacterias rizosféricas de los géneros *Bacillus* sp. y *Stenotrophomona maltophilia* aisladas de *E. globulus* y *E. nitens*, las cuales produjeron un aumento significativo en el enraizamiento en un rango de 19,4% y 69,4% con respecto al control, además de incrementar la formación de estacas y el aumento de la biomasa.

En cuanto al peso fresco, los resultados muestran que los tratamientos inoculados igualan los valores obtenidos en el control químico y superan al control sin inocular, resultados que concuerdan con los obtenidos por Rajkumar *et al.* (2005) quienes estudiaron la promoción de crecimiento vegetal generado por *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. en plantas de mostaza y reportaron un incremento en la longitud de la planta y el peso fresco y seco en comparación con las plantas no inoculadas, además de brindarle un efecto protector contra la absorción de Cromo.

Hassen y Labuschagne, (2010), revelaron que la inoculación individual de bacterias con potencial biofertilizante, estimulan el desarrollo de todos los estratos de la planta. La inoculación individual de cepas nativas de *B. simplex*, *B. cereus* y *Paenibacillus alvei* en trigo, resultó en un incremento significativo tanto en el peso fresco y seco de los brotes y raíces. En la parte aérea, y el peso fresco aumentó entre el 45% y 50% y el peso seco entre 39,7% y 45% respectivamente. De la misma forma, el aumento del peso fresco radical osciló entre el 55% y el 62% y la biomasa seca aumentó entre el 25% y el 49%. Asghar *et al.* (2004), encontraron que PGPR asociadas a la rizósfera de especies de *Brassica napus* aumentaron en un 58% la longitud de la raíz, 39% de la parte aérea, y 72% del peso seco total.

Se ha reportado el efecto de PGPR en la disponibilidad de nitrógeno, fósforo y potasio en suelos deficientes en éstos nutrientes que se ve reflejado en mayor absorción de los mismos por plantas de maíz inoculadas con cepas de *Pseudomonas alcaligenes* (PsA15), *Bacillus polymyxa* (BcP26) y *Mycobacterium phlei* (MbP18). (Egamberdiyeva, 2007) y en plantas de *Gossypium hirsutum* guisantes en una región semi-árida de Uzbekistán (Egamberdiyeva y Hoflich, 2004).

La inoculación de PGPR en pasturas y su efecto positivo en el crecimiento y nutrición vegetal ha sido demostrado previamente (Bonilla *et al.*, 2010). En trabajos realizados por Esqueda *et al.* (2002) se reporta un efecto positivo sobre la emergencia de plantas en seis especies de gramíneas inoculadas con *A. brasilense*. Esta respuesta fue atribuida a que la bacteria propicia un ambiente benéfico, incrementando la proliferación de vellosidades de la raíz, con lo que aumenta la absorción de agua y nutrientes.

CONCLUSIÓN

Las cepas 4K y 5B promovieron capacidades de crecimiento vegetal de *Pennisetum clandestinum* a los 100 y 130 d de muestreo, incrementando el peso fresco y seco de la planta en relación con el control químico, bajo condiciones de invernadero.

RECOMENDACIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio se recomienda continuar con estudios de inoculación de las especies de PGPR empleadas y dosis de fertilización nitrogenada para determinar las recomendaciones de fertilización a emplear.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul S, Gish W, Miller W, Myers W, Lipman D. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215 (3):403-410.
- Andrews M, James EK, Cummings SP, Zavalin AA, Vinogradova LV, McKenzie BA. 2003. Use of nitrogen fixing bacteria inoculants as a substitute for nitrogen fertiliser for dryland graminaceous crops: progress made, mechanisms of action and future potential. *Symbiosis* 35:209-229.
- Asghar H, Zahir Z, Arshad M. 2004. Screening rhizobacteria for improving the growth, yield, and oil content of canola (*Brassica napus* L.). *Aust J Agric Res* 55(2):187-194.
- AOAC, Association of Official Agriculture Chemists. 2005. Official methods of analysis 988.05. 18a ed. Washington DC.
- Ashelford K, Chuzhanova N, Fry JA. 2005. At least one in twenty 16S rRNA sequence records currently held in public repositories estimated to contain substantial anomalies *Appl Environ Microbiol* (12):7724-7736.
- Bashan Y, Holguin G. 1997. *Azospirillum*/plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can J Microb* 43:103-121.
- Bashan Y, Salazar B, Moreno M, Lopez R, Linderman R. 2012. Restoration of eroded soil in the Sonoran Desert with native leguminous trees using plant growth-promoting microorganisms and limited amounts of compost and water. *J Environ Manag* 102:26-36.
- Berg G. 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biotech* 84:11-18.
- Bertani G. 1952. Studies on Lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62:293-300.
- Bertani G. 2004. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *J. Bacteriol* 186:595-600.
- Bonilla R, Roncallo R, Baldani V, Barros J, Murillo J, Cardenas D, Castro E, Garrido M, Rivera M. 2010. Producción de fertilizantes biológicos a partir de microorganismos nativos del género *Azospirillum* sp. Ciencia y tecnología para la competitividad del sector agropecuario. Bogotá: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. pp. 140-141.
- Bray B, Kurtz L. 1945. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci* 59:39-45.
- Carcaño-Montiel MG, Ferrera-Cerrato R, Pérez-Moreno J, Molina-Galán JD, Bashan Y. 2006. Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. *Terra Latinoam* 24(4):493-502.
- Cárdenas D, Garrido MF, Bonilla M, Baldani VL. 2010. Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar. *Pastos y Forrajes* 33(3):285-300.
- Carreño R, Campos N, Elmerich C, Baca B. 2000. Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. *Mol Gen Genet* 264:521-30.
- Cassán F, Perrig D, Sgroy V, Masciarelli O, Penna C, Luna V. 2009. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur J Soil Biol* 45:28-35.
- Chowdhury S, Schmid M, Hartmann A, Kumar A. 2007. Identification of diazotrophs in the culturable bacterial community associated with roots of *Lasiurus indicus*, a perennial grass of thar desert, India. *Microb Ecol* 54:82-90.
- Díaz K, Valiente C, Martínez M, Castillo M, Santafuertes E. 2008. Root-promoting rhizobacteria in *Eucalyptus globulus* cuttings. *World J Microbiol Biotechnol* 25(5):867-873.
- Díaz K, Araya T, Valenzuela S, Sossa K, Martínez M, Peña-Cortés H, Santafuertes E. 2012. Production of phytohormones, siderophores and population fluctuation of two root-promoting rhizobacteria in *Eucalyptus globulus* cuttings. *World J Microbiol Biotechnol* 28(5):2003-2014.
- Doty SL, Oakely B, Xin G, Kang JW, Singleton G, Khan Z, Vajzovic A, Staley JT. 2009. Diazotrophic endophytes of native black cottonwood and willow. *Symbiosis* 47:23-33.
- Eckert B, Baller O, Kirchhof G, Halbritter A, Stoffels M, Hartmann A. 2001. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *Intl J Syst Evol Microbiol* 51:17-26.
- Egamberdiyeva D, Oflich G. 2004. Effect of plant growth-promoting bacteria on growth and nutrient uptake of cotton and pea in a semi-arid region of Uzbekistan. *J Arid Environ* 56:293-301.
- Egamberdiyeva D. 2007. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Uzbekistan Appl Soil Ecol* 56:184-189.
- Esqueda MH, Carrillo RL, Sosa M, Melgoza A, Royo MH, Jiménez J. 2002. Emergencia y sobrevivencia de gramíneas inoculadas con biofertilizantes en condiciones de invernadero. *Téc Pecú Méx* 43(3):459-475.
- Fiske C, Subbarow Y. 1925. The Colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 66:375-400.
- Garrido MF, Cárdenas D, Bonilla R, Baldani V. 2010. Efecto de los factores edafoclimáticos y la especie de pasto en la diversidad de bacterias diazotróficas. *Pastos y Forrajes* 33(4):1-7.
- Hassen AI, Labuschagne N. 2010. Root colonization and growth enhancement in wheat and tomato by rhizobacteria isolated from the rhizoplane of grasses. *World J Microbiol Biotechnol* 26:1837-1846.
- Idris A, Labuschagne N, Korsten L. 2009. Efficacy of rhizobacteria for growth promotion in sorghum under greenhouse conditions and selected modes of action studies. *J Agric Sci* 147:17-30.
- James E. 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Res* 65:197-209.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Inés Roldán, Lady Molano y Stella Mendieta por su colaboración en el desarrollo del presente estudio y al Ministerio de Agricultura y Fedegan por su apoyo y financiación de esta investigación.

- Kloepper JW, Lifshitz R, Zablutowicz RM. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol* 7:39-49.
- Lugtenberg B, Kamilova F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63:541-556.
- Marais JP, Figenschou DL, de Figueredo M. 1992. Effect of nutrient calcium on the cell wall composition and digestibility of kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum* Hochst). *Afr J Range For Sci* 9:72-75.
- Mehnaz S, Lazarovits G. 2006. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microb Ecol* 51:326-335.
- Obando M, Burgos L, Rivera D, Garrido M, Baldani VL, Bonilla R. 2010. Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, Cesar. *Acta Biol Colomb* 15(3):105-120.
- Okon Y. 2005. PGPR - technology cases of application and future prospects. En: Hartmann A, Schmid M, Wenzel W, Hisinger L, editores. 2004. *Rhizosphere—perspectives and Challenges—a Tribute to Lorenz Hiltner*. Munich, Alemania. pp. 273-274.
- Rajkumar M, Nagendran R, Jae K, Hyu W, Zoo S. 2006. Influence of plant growth promoting bacteria and Cr⁶⁺ on the growth of Indian mustard. *Chemosphere* 62:741-748.
- Rodríguez H, Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotech Adv* 17:319-339.
- Sevilla M, Gunapala N, Burris RH, Kennedy C. 2001. Enhancement of growth and N content in sugarcane plants inoculated with *Acetobacter diazotrophicus*. *Mol. Plant-Microbe Interact* 14:358-366.
- Shokri D, Emtiazi G. 2010. indole-3-acetic acid (iaa) production in symbiotic and non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria and its optimization by taguchi design. *Curr Microbiol* 61(3):217-225.
- Sidari M, Panuccio MR, Muscolo A. 2004. Influence of acidity on growth and biochemistry of *Pennisetum clandestinum*. *Biol Plant* 48(1):133-136.
- Sundara R, Shinha M. 1963. Organisms phosphate solubilizers in soil. *Soil Sci Plant Nutr* 9(2):45-49.
- Taulé C, Mareque C, Barlocco C, Hackembruch F, Reis V, Sicardi V, Battistoni F. 2012. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. *Plant Soil* 356:35-49.
- Vassilev N, Medina A, Azcon R, Vassileva M. 2006. Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake. *Plant and Soil* 287(1-2): 77-84