

**UNIVERSIDAD AUSTRA DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA DE AGRONOMIA

**Evaluación del efecto promotor en trigo (*Triticum aestivum*), de cepas bacterianas endófitas y rizosféricas, capaces de fijar di-nitrógeno molecular y producir fitohormonas aisladas de zarzamora (*Rubus constrictus*)**

Tesis presentada como parte de los  
requisitos para optar al grado de  
Licenciado en Agronomía

**Juan Luis Silva Henriquez**

VALDIVIA - CHILE

2009

**PROFESOR PATROCINANTE**

Luigi Ciampi P.  
Ing. Agr., M. Sc., Ph. D.

-----

**PROFESORES INFORMANTES**

Ricardo Fuentes  
Ing. Agr., M. Sc.

-----

Daniel Calderini  
Ing. Agr., Ph. D.

-----

## INDICE DE MATERIAS

<b>Capítulo</b>		<b>Página</b>
1.	INTRODUCCION	1
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1	Fijación biológica del Nitrógeno (FBN)	3
2.1.1	Bacterias de vida libre	4
2.1.1.1	Bacterias rizosféricas	4
2.1.1.1.1	Género <i>Azospirillum</i>	5
2.1.1.1.2	Género <i>Bacillus</i>	5
2.1.1.1.3	Género <i>Pseudomonas</i>	5
2.1.1.2	Bacterias endófitas	6
2.1.1.2.1	Género <i>Klebsiella</i>	6
2.1.2	La enzima nitrogena	6
2.1.3	Transferencia del N <sub>2</sub> fijado a las plantas	7
2.1.4	Promoción del crecimiento y el rendimiento vegetal	8
2.2	Bacterias productoras de fitohormonas	8
3	MATERIAL Y METODOS	10
3.1	Recolección de muestras	10
3.2	Procesamiento de muestras	10
3.3	Aislamiento de cepas bacterianas	10
3.4	Determinación de fijación biológica del nitrógeno	11
3.5	Determinación de biosíntesis de compuestos indólicos	11
3.6	Identificación taxonómica de las cepas promotoras de crecimiento vegetal	12
3.6.1	Medios selectivos	12
3.6.2	Pruebas bioquímicas	12

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>	
3.6.3	Pruebas bioquímicas con tubos deshidratados	14
3.7	Evaluación del efecto promotor del crecimiento vegetal en macetas	15
3.7.1	Desinfección de semillas	15
3.7.2	Encapsulación de cepas	16
3.7.3	Recuento bacteriano	16
3.7.4	Siembra en macetas e inoculación de cepas	16
3.7.5	Diseño experimental	17
3.7.6	Medición de variables de crecimiento y desarrollo	17
3.7.6.1	Determinación de peso seco	18
3.7.6.2	Determinación de área foliar	18
3.7.6.3	Determinación ancho y largo de lámina	18
3.7.6.4	Determinación de longitud, superficie y diámetro radical	18
3.7.6.5	Determinación de altura de plantas	18
3.7.6.6	Determinación del número de macollos, espigas y granos por m <sup>2</sup>	18
3.7.6.7	Determinación del peso individual de los granos	18
3.7.6.8	Determinación del rendimiento	19
3.7.7	Diseño estadístico	19
4	PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS	20
4.1	Aislamiento y selección de microorganismos promotoras de crecimiento	20
4.2	Producción de compuestos indólicos	21
4.3	Identificación taxonómica de cepas seleccionadas	25
4.3.1	Pruebas tintoriales y morfológicas	25
4.3.2	Pruebas bioquímicas	26
4.3.2.1	Género <i>Bacillus</i>	26
4.3.2.2	Género <i>Pseudomonas</i>	27
4.3.2.3	Enterobacterias	29
4.3.2.3.1	Pruebas de identificación bacteriana API 20 E	30

<b>Capítulo</b>		<b>Página</b>
4.4	Recuento de unidades formadoras de colonias en placas petri	31
4.5	Evaluación del efecto promotor en trigo de cinco cepas seleccionadas como fijadoras de N <sub>2</sub> y productoras de fitohormonas	32
4.5.1	Materia seca total	32
4.5.1.1	Materia seca aérea	33
4.5.1.1.1	Area foliar	35
4.5.1.1.1.1	Largo de láminas	36
4.5.1.1.1.2	Ancho de láminas	37
4.5.1.1.2	Altura de plantas	38
4.5.1.1.3	Peso seco de espigas	39
4.5.1.2	Peso seco radical	40
4.5.1.2.1	Superficie radical	42
4.5.1.2.2	Longitud radical	44
4.5.1.2.3	Diámetro radical	46
4.5.2	Rendimiento del trigo inoculado con las cepas bacterianas promotoras del crecimiento vegetal	46
4.5.2.1	Peso individual de los granos	47
4.5.2.2	Granos por m <sup>2</sup>	49
4.5.2.2.1	Espigas por m <sup>2</sup>	51
4.5.2.2.1.1	Número de macollos por m <sup>2</sup>	52
5	CONCLUSIONES	51
6	RESUMEN	52
	SUMMARY	54
7	BIBLIOGRAFIA	56
	ANEXOS	61

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Sigla de identificación, respuesta a la tinción de gram y morfología de los aislamientos capaces de fijar nitrógeno atmosférico	20
2	Valores de absorbancia de distintas concentraciones en ppm, determinados para constituir la curva de calibración de AIA	21
3	Producción de compuestos indólicos de las cepas en estudios a través del tiempo (ppm)	22
4	Clasificación de las bacterias según, Gram, morfología celular, motilidad y presencia de endospora de las cepas seleccionadas como fijadoras de N <sub>2</sub>	25
5	Pruebas bioquímicas realizadas a 5 cepas bacterianas: JS c6, JS c12, JS c24, JS c25 y JS c26 para establecer su pertenencia al género <i>Bacillus</i>	26
6	Pruebas bioquímicas realizadas a las cepas JS c1, JS c4, JS c5, JS c90 y JS c91 para establecer su pertenencia al género <i>Pseudomonas</i>	28
7	Pruebas bioquímicas realizadas las cepas JS c1, JS c4 y JS c5 para establecer su pertenencia a la familia de las Enterobacterias	29
8	Recuento de ufc de las cepas a densidad óptica de 0,6	31
9	Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo, sobre el diámetro radical en los tres estados fenológicos	44

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Curva de producción de compuestos indólicos de 3 cepas pertenecientes cada una a un género aislado y 2 cepas patrones.	24
2	Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo, sobre el peso seco total en tres estados fenológicos.	32
3	Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo sobre el peso seco aéreo en los tres estados fenológicos.	33
4	Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo, sobre el área foliar en los dos primeros estados fenológicos analizados.	34
5	Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo, sobre el largo de láminas en el estado fenológico de tres hojas.	35
6	Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo, sobre el ancho de láminas en el estado fenológico de tres hojas.	36
7	Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo, sobre la altura final de las plantas.	37
8	Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo, sobre el peso seco de las espigas en los dos últimos estados fenológicos.	38
9	Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo, sobre el peso seco radical en los tres estados fenológicos.	40
10	Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo, sobre la superficie radical en los tres estados fenológicos.	41
11	Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo, sobre la longitud radical en los tres estados fenológicos.	43

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
12	Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo, sobre el rendimiento (gramos por m <sup>2</sup> ).	45
13	Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo, sobre el peso seco individual de los granos.	46
14	Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo, sobre el número de granos por m <sup>2</sup> .	47
15	Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo, sobre el número de espigas por m <sup>2</sup> .	49
16	Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo sobre el número de macollos por m <sup>2</sup> en dos estados fenológicos.	50



## INDICE DE ANEXOS

<b>Anexo</b>		<b>Página</b>
1	Composición caldo de cultivo NFb	62
2	Análisis del suelo usado en las macetas	62
3	Valores de absorbancia a distintas horas de incubación para determinar las concentraciones en ppm de AIA	63
4	Análisis de varianza del parámetro de materia seca total para los tres estados fenológicos analizados.	63
5	Análisis de varianza área foliar para los estados de tres hojas y floración.	64
6	Análisis de varianza longitud de plantas.	64
7	Efecto de los tratamientos sobre la altura final de las plantas.	64
8	Análisis de varianza materia seca radical en estado de cosecha.	65
9	Análisis de varianza superficie radical en el estado de tres hojas.	65
10	Efecto de los tratamientos sobre la superficie radical en tres estados fenológicos.	65
11	Análisis de varianza longitud radical en el estado de tres hojas.	66
12	Efecto de los tratamientos sobre la longitud radical en tres estados fenológicos.	66
13	Análisis de varianza del rendimiento.	66
14	Análisis de varianza del componente del rendimiento granos por metro cuadrado.	67
15	Efecto de los tratamientos sobre el componente del rendimiento granos por metro cuadrado.	67
16	Efectos de los tratamientos sobre los parámetros: granos por planta y granos por espigas.	67
17	Efecto de los tratamientos en el estado de floración y grano sobre el número de espigas por planta.	68

<b>Anexo</b>			<b>Página</b>
18	Efecto de los tratamientos en el estado de floración y grano sobre el número de macollos por planta.	68	

## 1 INTRODUCCION

El trigo es el cultivo más importante para Chile, tanto en términos de volumen, superficie y valor económico de la producción. Además, posee significativos componentes sociales y laborales debido al gran requerimiento de mano de obra que genera. El consumo de trigo en el país (150 kilos/hab/año) es uno de los más elevados a nivel mundial, estimándose que sobre el 40% de las calorías presentes en la dieta nacional proviene de este cultivo.

La fertilización es una práctica indispensable para su producción, siendo la fertilización nitrogenada la más importante, debido a sus evidentes efectos sobre el rendimiento. La forma más conocida y empleada para suplir las necesidades de nitrógeno es la fertilización química, la cual representa una manera rápida de reponer el nitrógeno perdido del suelo, sin embargo, bajo un manejo inadecuado representa un riesgo ambiental por contaminación del suelo y del agua. Por otro lado, también se debe considerar que los fertilizantes representan costos económicos importantes para los productores. Es por ello que es necesario contar con opciones de fertilización que sean amigables con el ambiente y que disminuyan los costos de producción.

En los últimos años el estudio de nuevas alternativas que intentan una producción agropecuaria, más acorde con el medio ambiente ha ido en aumento. Estas nuevas formas tienen menos riesgos de contaminar y son más económicas. Una de ellas, es la utilización y aplicación a situaciones productivas de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR).

Estas bacterias aportan significativamente al crecimiento de las plantas, debido a que pueden aumentar la disponibilidad de nutrientes, pueden suprimir patógenos mediante la producción de antibióticos. Asimismo, pueden elaborar sustancias antagonistas para otros hongos y bacterias del suelo. De igual manera, pueden

secretar auxinas y otras hormonas. Todas estas actividades han sido relacionadas con las PGPR y se han descrito como favorables para las plantas cultivadas.

Existen diversas especies pertenecientes a este grupo, sin embargo entre los principales géneros se destacan representantes de: *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pantoea* y *Serratia*.

Algunas de las especies pertenecientes a los géneros mencionados pueden transformar el nitrógeno atmosférico, mediante el proceso conocido como fijación biológica del di-nitrógeno, (FBN). Otras, son capaces de solubilizar formas de fósforo dejándolo en una forma más aprovechable por las plantas.

La hipótesis planteada en esta investigación, postula que: “bacterias aisladas desde la rizósfera y del interior de *Rubus constrictus*, son capaces de fijar  $N_2$  y producir fitohormonas”.

Se plantea como objetivo general:

“Aislar, identificar y evaluar la acción promotora del crecimiento vegetal en plantas de *T. aestivum* de cepas bacterianas obtenidas desde la rizósfera de *Rubus constrictus*.”

Los objetivos específicos son:

- seleccionar bacterias con capacidad de fijación biológica del di-nitrógeno molecular ( $N_2$ ).
- Determinar la capacidad productora de fitohormonas, de las bacterias seleccionadas.
- Caracterizar taxonómicamente a las bacterias seleccionadas como promotoras del crecimiento vegetal.
- Evaluar el efecto promotor del crecimiento vegetal de las bacterias seleccionadas e inoculadas junto a semillas de *T. aestivum*, cultivar Pandora, en tres estados fenológicos del trigo.

## 2 REVISION BIBLIOGRAFICA

### 2.1 Fijación biológica del Nitrógeno (FBN)

El nitrógeno es un elemento abundante en nuestra atmósfera. Sin embargo, se encuentra en una forma poco aprovechable. Las plantas no pueden usarlo en su forma elemental ( $N \equiv N$ ). Es por la estabilidad de este elemento que los vegetales tienen que obtenerlo del suelo, principalmente como nitrato. El nitrógeno molecular (donde los átomos de nitrógeno se unen de dos en dos) no es fácilmente asimilable por los organismos. El motivo se debe a la unión entre los átomos que está formada por un triple enlace muy difícil de romper. La única manera de poder usar el nitrógeno molecular de la atmósfera, es llevar a cabo una reacción química donde se rompe este triple enlace y se incorporan átomos de hidrógeno para fabricar amoníaco, un compuesto que los organismos sí son capaces de procesar metabólicamente. Sólo un grupo selecto de bacterias es capaz de atrapar y aprovechar el nitrógeno de la atmósfera como nutriente, es decir, de llevar a cabo este proceso de FBN, donde es reducido a amonio y por ello son conocidas como “bacterias fijadoras de nitrógeno”(OLIVARES, 2006).

Las cantidades de nitrógeno (N) que se incorporan a los sistemas productivos vía fijación biológica se estiman entre 139 a 170 millones de ton / N /año, de las cuales entre un 25 a 30 % se debe a asociaciones simbióticas en el suelo cultivado. Otro 30% es a través de pastizales permanentes. El resto se explica por otras asociaciones o por fijación realizada por microorganismos de vida libre (CERVANTES, 2001).

Los microorganismos fijadores de nitrógeno no constituyen un grupo taxonómico homogéneo. La única característica que comparten es la presencia de la enzima nitrogenasa. Dichas bacterias comprenden organismos fotótrofos, como especies de bacterias pertenecientes a la familia Rhodospirillaceae, Clorobiaceae y Cianobacteria; quimioautótrofos, como especies de los géneros *Thiobacillus*, *Xanthobacter* y *Desulfovibrio* y heterótrofos como las especies pertenecientes a la

familia Frankiaceae, al grupo Rhizobiaceae y a los géneros *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Clostridium* (REDONDO-NIETO, 2006).

Todos estos grupos de microorganismos pueden realizar la FBN ya sea independientemente o estableciendo relaciones simbióticas con otros organismos (REDONDO-NIETO, 2006).

**2.1.1 Bacterias de vida libre.** Durante muchos años se consideró que el efecto de las bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN), sólo provenía de la utilización por las plantas del amonio excretado; así existen numerosas publicaciones que prueban tal efecto. Sin embargo, se ha encontrado algunas especies de bacterias que también producen fitohormonas (auxinas, giberelinas y citocininas) que afectan favorablemente el crecimiento de las plantas, particularmente de la raíz. Más recientemente, se ha reportado que las BFN incrementan la capacidad radical de absorción de nitrato, indirectamente como una consecuencia la estimulación del desarrollo radical y directamente por estimulación del sistema transportador del compuesto (MAYZ-FIGUEROA, 2004)

Las BFN de vida libre son de gran importancia debido a que pueden desarrollarse asociadas a la rizósfera de plantas distintas a las leguminosas, lo que ha adquirido gran importancia en la producción de cereales y praderas (LOIRET *et al* 2004).

Las especies que poseen la capacidad de fijar  $N_2$  en forma de vida libre se les denomina diazotófos. Dentro de este grupo existen varios géneros, sin embargo los más conocidos son especies pertenecientes a los géneros: *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Gluconacetobacter* (BACA *et al* 2000).

**2.1.1.1 Bacterias rizosféricas.** Hiltner en 1904 observó por primera vez la acumulación de microorganismos en la zona radical y propuso el término "rizósfera". Los exudados radicales de las plantas, conformados por diversas sustancias crean alrededor de esta zona un ambiente nutricional enriquecido que favorece el crecimiento bacteriano,

dentro de estos exudados se encuentran carbohidratos y aminoácidos. Sin embargo, la composición y cantidad de exudados varía con la especie presente y las condiciones abióticas, tales como agua y temperatura (MAYZ-FIGUEROA, 2004).

2.1.1.1.1 Género *Azospirillum*. La primera especie aislada fue *Azospirillum lipoferum* (syn: *Spirillum lipoferum*) en Holanda en 1925 (BEIJERINCK, 1925) y de la cual en la actualidad se reconoce siete especies: *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, *A. irakense*, *A. largimobile* y *A. doebereinae*. Desde entonces, esta última ha sido aislada de varias especies cultivadas y silvestres y de varios tipos de suelo (MAYZ-FIGUEROA, 2004).

2.1.1.1.2 Género *Bacillus*. Al comienzo las únicas especies de *Bacillus* que se conocía que eran capaces de fijar nitrógeno eran *B. polymyxa* y *B. macerans*. Posteriormente, *B. circulans* fue también sugerido, pero no ha sido confirmado. *B. polymyxa* es responsable de la fijación en praderas xerófitas en UTAH (1979). Por otra parte, *B. polymyxa* y *B. macerans* fueron aislados desde la rizósfera de praderas en Canadá.

Posteriormente *B. azotofixan*, fue aislado desde el suelo, praderas y raíces de trigo en tres distintas zonas de Brasil. Esta especie es un eficiente fijador de  $N_2$ . También ha sido encontrado en raíces de caña de azúcar en Brasil y Hawái. Esta es capaz de fijar cantidades relativamente altas (20 a 240  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{ml/h}$ ), lo más importante es su capacidad a fijar  $N_2$  en presencia de altos niveles de  $\text{NO}_3^-$  (DÖBEREINER y PEDROSA, 1987).

2.1.1.1.3 Género *Pseudomonas*. Representantes de este género son muy comunes en la rizósfera y en algunas cepas se ha demostrado la habilidad de fijar  $N_2$ , lo que se ha sugerido de gran importancia en asociación con cereales. La habilidad fijadora del género ha sido cuestionada, pero se ha demostrado que *Pseudomonas stutzeri* posee esta característica (DÖBEREINER y PEDROSA, 1987; XIE *et al.*, 2006).

Esta especie fue aislada desde un cultivo de arroz, fija nitrógeno en forma de vida libre, bajo condiciones microaerobias (DÖBEREINER y PEDROSA, 1987).

2.1.1.2 Bacterias endófitas. Los estudios sobre microorganismos endófitos fijadores de nitrógeno han tomado gran importancia en la actualidad. Esto es debido, a estudios pioneros sobre el potencial agrobiotecnológico de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Las características que se destacan dentro de este grupo son su hábitat endófito y su capacidad de fijar  $N_2$  ante la presencia de nitratos. Esto es debido, a que al multiplicarse dentro de la planta existirá una menor competencia por los nutrientes en comparación con el ambiente rizosférico. Por otro lado, podría disponer de abundantes fuentes de carbono, producto de la fotosíntesis, para llevar a cabo la fijación de nitrógeno, aún cuando los cultivos fueran fertilizados con este nutriente. El nitrógeno, producido por la fijación sería excretado directamente en el interior de los tejidos de la planta, el cual lo utilizaría para la síntesis de sus macromoléculas esenciales (MUÑOZ y CABALLERO, 2002).

2.1.1.2.1 Género *Klebsiella*. La técnica del isótopo  $N^{15}$  y la reducción del acetileno (ARA) fue utilizada para verificar la capacidad de fijar nitrógeno de algunas cepas de *Klebsiella pneumoniae*, en asociación con *Poa pratensis* y *Triticum aestivum* (KIELO y KARI, 1986).

Cepas fijadoras de nitrógeno del género *Klebsiella* han sido aisladas desde, varios hábitats. Han sido aisladas desde hojas de plantas tropicales e incluso desde el intestino humano (STREICHER *et al* 1971).

**2.1.2 La enzima nitrogenasa.** La incorporación de nitrógeno a la biosfera ocurre gracias a la existencia de las bacterias fijadoras que poseen la enzima nitrogenasa. Esta constituye una proteína de gran tamaño molecular que consta de dos componentes, la parte homodimérica (alfa: alfa) que contiene hierro, conocida como nitrogenasa reductasa y que es codificada por el gen *nif H*, y la proteína tetramérica (alfa: alfa: beta: beta) que contiene hierro y molibdeno, codificada por los genes *nif D* y *nif K*, designada simplemente como nitrogenada (OLIVARES, 2006).



La nitrogenasa reductasa, activada por ATP-Mg, transfiere los electrones a la nitrogenasa que a su vez los distribuye entre el nitrógeno molecular ( $N \equiv N$ ) y protones para entregar amoníaco e hidrógeno. Esta reducción de protones es siempre concomitante con la producción de amonio (OLIVARES, 2006).

La enzima nitrogenasa es fácilmente inactivada por el oxígeno, de tal forma que todos los sistemas fijadores han desarrollado estrategias especiales para protegerse de concentraciones elevadas de este elemento y evitar su inactivación, si es que se ha sintetizado. Estas estrategias, van desde la anaerobiosis total, como en *Clostridium*, a la producción de gran cantidad de polisacáridos extracelulares que hacen de filtro para el oxígeno. La exclusión metabólica (*Azotobacter*); y la compartimentación, como ocurre con las cianobacterias. En la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, la estructura del nódulo crea el ambiente microaeróbico adecuado y la leghemoglobina facilita el transporte de oxígeno al bacterioide para soportar el metabolismo aeróbico requerido para obtener la energía necesaria para la reducción del  $N_2$  (VESSEY *et al.*, 2005).

En bacterias aeróbicas como es el caso de *Frankia*, se produce un dilema, debido a que estas bacterias requieren de un adecuado flujo de oxígeno ( $O_2$ ) para realizar la fosforilización oxidativa que provee de energía requerida para la actividad de la nitrogenasa. La protección de la nitrogenasa en la especie de vida libre *Nostoc* es perfecta debido al aislamiento de la enzima en una estructura llamada heterocistos (VESSEY *et al.*, 2005).

**2.1.3 Transferencia del  $N_2$  fijado a las plantas.** Las plantas se benefician de la FBN cuando reciben el N fijado. El producto de la nitrogenasa es la producción de amoníaco ( $NH_3$ ). Una proporción de él forma amonio ( $NH_4$ ).

Un canal iónico específico para cationes monovalentes, facilita el transporte del  $NH_4$ , ingresando así al citoplasma. Aquí actúan las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato-oxoglutarato aminotransferasa (GOGAT), las cuales son importantes para la síntesis de aminoácidos (VESSEY *et al.*, 2005).

**2.1.4 Promoción del crecimiento y el rendimiento vegetal.** El aumento del rendimiento de los cultivos cereales, debido a la inoculación con BFN, ha sido observado en varios trabajos que se citan a continuación:

BHATTARAI y HESS (1993). Demostraron un incremento significativo en el número de granos de trigo, al inocular con *Azospirillum*, este incremento fue de 8,8 a 25,2 % sobre el testigo.

También se ha encontrado un efecto positivo sobre el número de espigas por plantas, espiguillas por espigas y fertilidad de espigas, al inocular semillas de trigo con *Azospirillum* (MILLET y FELDMAN, 1984).

El crecimiento y el incremento del rendimiento puede ser estimulado por bacterias promotoras del crecimiento de las plantas, debido a la habilidad de fijar nitrógeno y la capacidad de producir fitohormonas que influyen en el crecimiento (SAHIN *et al.*, 2004).

En otro trabajo, además de trigo se inoculó avena con la especie *Azospirillum brasilense*, donde ésta promovió significativamente la concentración de clorofila en un 15%, en ambos cultivos; además produjo un incremento del rendimiento, entre 1 a 27% en trigo y entre 2 a 6 % en avena (SWEDRZNSKA, 2000).

## **2.2 Bacterias productoras de fitohormonas**

El mecanismo de acción de las PGPR más directo es la producción de fitohormonas. Se ha descrito un gran número de especies bacterianas que son capaces de producir precursores de auxinas bajo condiciones “*in vitro*”.

KHALID *et al.*, (2003) en una serie de experimentos en laboratorio sobre dos cultivares de trigo bajo condiciones axénicas demostraron un incremento en la elongación de la raíz por sobre un 17,3%; en el peso seco de la raíz sobre 13,5 %; en la elongación de tallo sobre un 37,7% y sobre un 36,6% en el peso seco del tallo. Estos valores dieron como resultado una correlación lineal positiva ( $r = 0,99$ ) entre la producción de auxina “*in vitro*” y el incremento de parámetros de crecimientos.

Además, estos mismos autores encontraron mediante análisis colorimétricos que el monto de producción de auxinas por rizobacterias “ *in vitro*” es variable desde 1,1 a 12,8 mg/L. Sin embargo, al agregar triptófano, la biosíntesis de auxinas es estimulada (el rango de producción es entre 1,8 a 4,8 mg / L). Así mismo, demostraron mediante análisis de HPLC que el ácido indólacético (AIA) e indólacetamida (IAM) son los precursores de las auxinas más presentes en los filtrados de los cultivos bacterianos.

TORRES *et al.*, (2000) encontraron que bacterias pertenecientes a las siguientes especies: *Azotobacter chroococcum*, *A. vinelandii*, *P. putida*, *Serratia* spp. y *K. pneumoniae*, aisladas de la rizósfera de arroz en Colombia fueron capaces de producir AIA en concentraciones que van de 3,5 mg/L a 32 mg/L.

Algunas especies de los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Bacillus* favorecen el crecimiento de la planta, mediante la producción de AIA, giberelina y citoquininas en la rizósfera de las plantas cuando éstas están en estado de plántulas (BROWN *et al.*, 1974).

PROBANZA *et al.*, (1996), citado por CERVANTES (2001), encontraron que entre las rizobacterias de aliso, hay algunas del género *Bacillus* que estimulan la germinación y el crecimiento vegetal.

Otra hormona implicada en la acción de las PGPR es el etileno. Se ha demostrado que *Pseudomonas putida* es capaz de sintetizar la 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa, esta enzima hidroliza el 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), precursor inmediato de la biosíntesis del etileno. El etileno, estimula la germinación y rompe la dormancia de las semillas (ESASHI, 1991).

### 3 MATERIAL Y METODOS

#### 3.1 Recolección de muestras

Con el objeto de detectar PGPR se realizó un muestreo dirigido, es decir, se tomaron partes de la raíz y muestras de la rizósfera de la planta perteneciente a la especie *Rubus constrictus* (murra). Se seleccionaron plantas con un crecimiento exacerbado. Las muestras fueron recolectadas del predio Santa Rosa, propiedad de la Universidad Austral de Chile (Valdivia) y del sector Crucero perteneciente a la comuna de Río Bueno.

#### 3.2 Procesamiento de muestras

Una vez recolectadas las muestras se procedió a separar la rizósfera del resto de material. Cada muestra se dividió en dos submuestras, una perteneciente a la rizósfera y otra a otras partes de la planta (raíz).

#### 3.3 Aislamiento de cepas bacterianas

La rizósfera de la primera submuestra fue lavada con agua destilada estéril, posteriormente se agitó durante 10 min junto con agua estéril, esto se realizó dos veces. La segunda submuestra se agitó con una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante un período de 30 min, luego se procedió a realizar un lavado con agua destilada estéril de la misma forma que la primera submuestra, por el mismo período de tiempo e igual número de veces. La solución con hipoclorito de sodio se utilizó para desinfectar las partes exteriores de los trozos de plantas para así poder aislar microorganismos endofíticos. Posteriormente a ambas submuestras se le realizaron diluciones seriadas y se sembró en Agar Papa Dextrosa (APD) las diluciones desde la  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$ , con el objetivo de obtener colonias, luego cada colonia en forma individual se sembró nuevamente en APD para obtener cultivos puros.

### 3.4 Determinación de fijación biológica del nitrógeno

Una vez obtenidos los cultivos puros, se procedió a obtener una colonia y proceder a sembrarla en caldo NFb que carece de nitrógeno (Anexo 1). Posteriormente fue incubada en un agitador orbital a 100 rpm, durante 48 horas a 30 °C para así poder determinar en forma cualitativa su capacidad fijadora. Originalmente, este caldo es de color amarillo, una vez que el microorganismo es capaz de crecer en él, cambia a azul, debido a la oxidación del malato, indicando que el microorganismo es capaz de fijar el nitrógeno.

### 3.5 Determinación biosíntesis de compuestos indólicos

Para poder determinar la producción de estos compuestos por parte de los aislamientos, primero se preparó el reactivo de Salkowsky, el cual se obtiene preparando  $H_2SO_4$  a 7,9 M y luego agregando  $FeCl_3$  al 3 %.

Posteriormente, se obtuvo la curva de calibración de un compuesto indólico, para lo cual realizaron mediciones de absorbancia de concentraciones conocidas (0, 3, 12, 18, 24, 40, 50 ppm) del ácido indolacético (AIA). Para poder medir se agregó a 2 mL de reactivo de Salkowsky y 1 mL de la solución con AIA, luego se deja durante un período de 30 min, finalmente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (spectronic modelo genesys 8.0) a 530 nm.

Las cepas fueron inoculadas en 100 mL de caldo tripticasa de soya suplementado con 0,01g de triptófano e incubadas en un agitador orbital a 30 °C y 100 rpm. A cada hora de medición se extrajeron 5 mL del matraz y se colocaron en un tubo de ensayo. Luego éste se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min. Posteriormente, se extrajo un 1 mL de sobrenadante, el cual es colocado en cubetas junto con 2 mL de reactivo de Salkowsky, luego se dejó durante 30 min para que adquiriera un color rosado, típico de la reacción y luego se midió por espectrofotometría.

Además se utilizaron 3 cepas controles para validar el método pertenecientes a los géneros: *Pantoea* y *Serratia*. Estas producen cantidades altas de AIA. La otra cepa pertenece a la especie *Pseudomonas putida*, la cual produce cantidades bajas de AIA.

### 3.6 Identificación taxonómica de las cepas promotoras de crecimiento vegetal

Este procedimiento se realizó utilizando medios selectivos. Además, se usó tinciones y pruebas bioquímicas.

**3.6.1 Medios selectivos.** Se utilizaron los siguientes medios de cultivos selectivos y diferenciales, líquidos (caldos) y agaros (sólidos) para poder determinar a la especie que pertenece cada cepa aislada.

- Medio de cultivo NFb, (DÖBEREINER *et al*, 1976) éste permite el aislamiento y crecimiento de microorganismos que pueden fijar biológicamente  $N_2$ , debido a que es deficiente en nitrógeno (Anexo 1).
- Medio pirocianinas y fluoresceínas (medios P y F), permite observar, a luz ultravioleta, el desarrollo de pigmentos provocados por bacterias del género *Pseudomonas*.
- Agar MacCONKEY, medio de cultivo para bacterias de la familia de las Enterobacteriaceae. Contiene sales biliares y lactosa como fuente de carbono. Otros géneros como *Azospirillum*, *Herbaspirillum* o *Pseudomonas* no se desarrollan o crecen en este medio de cultivo.

**3.6.2 Pruebas bioquímicas.** Se utilizaron las siguientes pruebas bioquímicas

- Test de la oxidasa: permite identificar a géneros como *Neisseria* y *Pseudomonas*.
- Test de la catalasa: Prueba de la catalasa: La catalasa es una enzima que protege a las células frente al peróxido de hidrógeno producido en el metabolismo del oxígeno. Cataliza la formación de agua y oxígeno a partir del peróxido de hidrógeno. La actividad catalasa se detecta añadiendo unas gotas de peróxido de hidrógeno (3%) sobre colonias en medio que no sea de agar sangre (daría falsos positivos). La producción de burbujas indica la presencia del enzima.

Es útil para distinguir *Streptococcus* (negativa) de *Staphylococcus* (positiva) y *Clostridium* (negativa) de *Bacillus* (positiva).

- Utilización de la urea: Permite establecer si tiene presente la enzima ureasa que hidroliza la urea ( $\text{H}_2\text{N-CO-NH}_2$ ) y origina amonio lo que producirá un incremento del pH que puede detectarse con un indicador (rojo fenol). Las bacterias se inoculan en un medio con glucosa-peptona y urea al 2%.
- Utilización del citrato: Esta prueba es para determinar si la bacteria en estudio es capaz de usar citrato como única fuente de carbono y energía.
- Prueba O/F: Esta prueba permite identificar bacterias de forma bacilar, gram negativo y de vida aerobia o anaerobia facultativa. En condiciones aerobias las bacterias pueden oxidar la glucosa hasta  $\text{CO}_2$  y gas. En condiciones anaerobias sólo puede ser utilizada por vía de la fermentación. En este test se evalúa la capacidad de las bacterias para oxidar y/o fermentar produciendo ácido que se detecta gracias al azul bromotimol (indicador de pH). Las bacterias que utilizan la glucosa de ambas forma se designan: +/+, las que solamente oxidan la glucosa se designan como: +/-, y finalmente las que sólo utilizan la glucosa por fermentación se designan como: -/+.
- Prueba del indol: Esta permite detectar la acción de la enzima triptofanasa, la cual degrada al triptófano presente en la peptona, produciendo indól.
- Test de Voges –Proskauer: Determina si la bacteria realiza fermentación formica tipo butilenglico I, produciendo butilenglicol, acetona, ácidos orgánicos. Bacterias como *Aerobacter* y *Serratia* realizan este tipo de fermentación.
- Reducción de Nitrato: Esta reacción la pueden realizar bacterias del tipo anaerobios facultativos, mediante respiración anaeróbica, siendo el último aceptor de H el  $\text{NO}_3$ , produciéndose nitrito, amoníaco

- TSI: El agar triple azúcar hierro es un medio nutriente y diferencial que permite estudiar la capacidad de producción de ácido y gas a partir de glucosa, sacarosa y lactosa en un único medio. También permite la detección de la producción de H<sub>2</sub>S. Es un medio útil para la identificación de Enterobacterias. El agar se prepara en forma de pico de flauta. Esto determina que existan dos cámaras de reacción dentro del mismo tubo. La porción inclinada (pico) expuesta en toda su superficie al oxígeno es aerobia y la porción inferior (fondo) está protegida del aire y es relativamente anaerobia. Al crecer un microorganismo (m.o.) en el TSI, el pico tiende a virar al pH alcalino (color rojo por el rojo fenol) por la producción de aminas, debido a la utilización aerobia de las peptonas, al ocurrir esto se designa con la letra K. En el fondo del tubo donde no hay oxígeno la degradación de peptonas es menor y no se generan aminas, de manera que se pueden detectar la producción de pequeñas cantidades de ácido (color amarillo por el rojo fenol), esto se designa con la letra A. Si se inoculan m.o. no fermentadores no se formarán ácidos, pero por la producción de aminas en el pico, todo el medio quedará rojo (K, K).
- Test del rojo metilo: Determina si la bacteria realiza fermentación fórmica de ácidos mixtos o tipo *Escherichia coli*.
- Licuación de la gelatina: La mayoría de los polímeros son demasiado grandes para ser transportados dentro de las células. Las bacterias excretan enzimas extracelulares (gelasa) que hidrolizan estos polímeros transportando al interior de la célula en monómeros que les sirven para crecer.
- Licuación del almidón: Esta prueba permite apreciar la presencia de la enzima amilasa presente en algunas bacterias.
- Producción de gas sulfhídrico: Permite ver si tiene la enzima desulfidrasa, la que produce H<sub>2</sub>S a partir de aminoácidos azufrados

**3.6.3 Prueba bioquímica con tubos deshidratados.** Esta se utilizó para bacterias que fueron identificadas como pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. Para ello



se usó las pruebas bioquímicas de microtubos deshidratados denominada APi 20 E. Este sistema, es muy adecuado para Gram negativos específicos de la familia Enterobacteriaceae, está estandarizado y combina 8 pruebas convencionales y 12 de asimilación. El "kit" consta de una galería de 20 microtubos conteniendo medios o sustratos en forma deshidratada. Los tests convencionales se inocularon en una suspensión bacteriana de la cepa en estudio en solución fisiológica (1 µL). Tras un período de incubación de 18-24 h a 30° C se pueden observar virajes de color en el medio. La lectura del APi 20 E (Biomérieux) se realiza mediante la obtención de un código, que permite a través de un software identificar la especie bacteriana en cuestión. (Los carbohidratos y reactivos utilizados en esta prueba de identificación bacteriana corresponden a: D-glucosa, D-manitol, inositol, D-sorbitol, L-ramnosa, D-sacarosa, D-melibiosa, amigdalina, L-arabinosa, 2-nitro-fenil-D-galactopiranosida, L-arginina, L-lisina, L-ornitina, citrato trisódico, tiosulfato sódico, urea, L-triptófano a 0,19 y 0,38 mg/micro tubo, piruvato sódico y gelatina de origen bovino).

### **3.7 Evaluación del efecto promotor del crecimiento vegetal en macetas.**

Se inocularon cinco cepas bacterianas las cuales fueron: JS c5 y JS c12 (ambas cepas se eligieron por producir la mayor cantidad de compuestos indólicos), JS c26 se eligió por ser la única que pertenece al género *Bacillus* aislada del sector Crucero, la cepa JS c91 se eligió por ser la única cepa pura perteneciente al género *Pseudomonas* en el momento de la encapsulación (la cepa JS c90 después de su aislamiento e identificación se contaminó con otras cepas) y la cepa JS c4 por ser la única cepa junto con JS c5 pertenecientes al género *Klebsiella*, ya que las cepas restantes pertenecen todas al género *Bacillus*.

La especie vegetal utilizada fue trigo (*Triticum aestivum* L), cultivar Pandora la cual fue sembrada en macetas para evaluar el efecto promotor en tres estados fenológicos (tres hojas, floración y grano).

**3.7.1 Desinfección de semillas.** Las semillas de cultivar Pandora fueron puestas a agitar junto con una solución de hipoclorito de sodio al 20% y 0.1 % de Tween 80 durante 30 min, posteriormente se le realizó 3 lavados con agua destilada estéril por 10 min cada uno.

**3.7.2 Encapsulación de cepas.** Para poder realizar este proceso primero cada cepa se incubó en matraces con 150 mL de caldo peptona durante 48 h a 30 ° C en un agitador orbital a 100 rpm. Luego se preparó una solución matriz con alginato al 10%, posteriormente se colocaron 138 mL de solución matriz en matraces. En forma paralela se centrifugó a 9000 rpm durante 15 min los caldos con bacterias a densidad óptica de 0,6 y se eliminó el sobrenadante dejando 12 mL que contenían las bacterias en forma más concentrada, el cual se incorporó a los 138 mL de solución matriz para obtener un volumen de 150 mL el cual se mezcló y se encapsuló.

Una vez obtenido el volumen, se procedió a pasarlo por el encapsulador, del cual sale la solución bacteriana en forma de gotas, las cuales caen a un recipiente con  $\text{Ca}_2(\text{OH})$  a 0,1 M el cual hace que se forme la capsula con una cubierta que protege a las bacterias del medio.

**3.7.3 Recuento bacteriano.** Este se realizó para saber la concentración de bacterias a densidad óptica de 0,6. Se sembró e incubó a 30 ° C las cepas en caldo peptona hasta obtener una densidad óptica de 0,6, luego una vez obtenida esta densidad se realizaron diluciones seriadas, las cuales fueron sembradas en agar peptona (AP), posteriormente una vez crecidas las cepas en el agar se realizó el recuento bacteriano en UFC/mL.

**3.7.4 Siembra en macetas e inoculación de cepas.** Para realizar la siembra primero se tamizó el suelo, el cual fue recolectado del predio Santa Rosa, ubicado en la Región de los Ríos, perteneciente a Universidad Austral de Chile (Anexo 2). Una vez tamizado se llenaron las macetas las cuales tenían una profundidad de 30 cm y una área de 0,027  $\text{cm}^2$ .

Después de haber llenado las macetas se sembraron en cada una 10 semillas de trigo, junto a éstas se colocaron 4 cápsulas que contenían a la bacteria en estudio. Una vez emergidas las plántulas se seleccionaron las 8 mejores quedando éstas finalmente en las macetas.

Posteriormente se realizaron 3 aplicaciones junto al riego de soluciones bacterianas a densidad óptica de 0,6. Estas se aplicaron en el estado de tres hojas, macollo y floración.

El ensayo se sembró el 15 de enero del año 2007, la primera cosecha se realizó el 15 de febrero, la segunda el 5 de abril y la última el 15 de junio del mismo año.

**3.7.5 Diseño experimental.** Se realizaron los siguientes tratamientos:

- a) Plantas sin cápsulas (sin bacterias), como testigo.
- b) Plantas inoculadas con la cepa JS c4 (*Klebsiella*).
- c) Plantas inoculadas con la cepa JS c5 (*Klebsiella*).
- d) Plantas inoculadas con la cepa aislada JS c12 (*Bacillus*).
- e) Plantas inoculadas con la cepa aislada como JS c26 (*Bacillus*).
- f) Plantas inoculadas con la cepa aislada JS c91 (*Pseudomonas*).

**3.7.6 Medición de variables de crecimiento y desarrollo.** Las variables de crecimiento y desarrollo vegetal medidas fueron:

- a) peso seco parte aérea
- b) peso seco raíces
- c) peso seco total
- d) área foliar
- e) ancho de lámina
- f) largo de lámina
- g) área radical
- h) longitud radical
- i) diámetro radical
- j) altura de plantas
- k) número de macollos por m<sup>2</sup>
- l) número de espigas por m<sup>2</sup>
- m) número de granos por m<sup>2</sup>
- n) peso seco de espiga
- ñ) peso seco granos

## o) rendimiento

3.7.6.1 Determinación de peso seco: Esta medición se realizó cuando en horno durante 48 h a 105° C, las partes aéreas y radicales de las plantas. Después de este período se midieron los pesos.

3.7.6.2 Determinación de área foliar : Las láminas de cada planta fueron separadas y pasadas por un areafoliómetro, el cual tiene unos focos que permite proyectar la sombra de las hojas y su superficie es registrada en cm<sup>2</sup>.

3.7.6.3 Determinación ancho y largo de lámina: Para realizar estas mediciones se seleccionaron 9 plantas por cada tratamiento, se seleccionaron 3 plantas de menor tamaño, 3 plantas de un tamaño intermedio y tres de tamaño más grande. Después de cada planta seleccionada se le midió el ancho (para medir éste se seleccionó la parte más ancha de la lámina) y largo de las láminas

3.7.6.4 Determinación de longitud, superficie y diámetro radical: Para estos parámetros se utilizó un programa computacional llamado WinRHIZO Basic, el cual consiste en un escáner donde queda registrada la imagen de las raíces, además posee un software que entrega los valores de longitud radical en cm, el área en cm<sup>2</sup> y diámetro radical en mm.

3.7.6.5 Determinación de altura de plantas: Esta se realizó una vez completado el ciclo de cultivo del trigo, para esto se midió con una regla desde la base hasta la parte más alta de la planta (las espigas).

3.7.6.6 Determinación del número de macollos, espigas y granos por m<sup>2</sup>: Se midieron el número total de estos tres parámetros por cada maceta y como se dijo anteriormente que cada maceta presenta un área de 0,027 m<sup>2</sup>. Posteriormente se calculó para la superficie de 1 m<sup>2</sup>.

3.7.6.7 Determinación del peso individual de los granos: una vez que la planta se encontraba en el estado de cosecha (grano maduro), se pesaron todos los granos de

la maceta (repetición), después este peso se dividió por el número total de grano de dicha maceta, obteniendo así el peso individual los granos.

3.7.6.8 Determinación del rendimiento: como anteriormente se habían medido las variables de número de grano por superficie y el peso individual de los granos, se procedió a determinar esta variable. Para medirla se multiplicó el peso individual del grano por el número de granos por superficie.

**3.7.7 Diseño estadístico.** El modelo que se utilizó correspondió a un diseño enteramente al azar, con 6 tratamientos y 5 repeticiones.

Para probar homogeneidad de varianza se usó el Test de Hartley

Los resultados obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA o ANDEVA) utilizando el programa estadístico Statgraphics Plus versión 5.1. con el cual se evaluaron si los diferentes tratamientos presentaron diferencias estadísticas.

Una vez realizada el ANDEVA y si este arrojó diferencias estadísticas, se analizaron las diferencias entre medias individuales mediante la prueba de Tukey con un valor  $P < 0,05$ . También se graficó la barra de DHS (Diferencia honestamente significativa) de Tukey

## 4 PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS.

### 4.1 Aislamiento y selección de microorganismos promotores de crecimiento.

De la rizósfera y de las raíces de plantas de *R. constrictus*, que presentaron un crecimiento exagerado, se obtuvieron 50 cepas bacterianas puras (30 cepas de Santa Rosa y 20 cepas de Crucero), que se desarrollaron en medio de cultivo APD.

Se seleccionaron aquellos microorganismos que fueron capaces de fijar nitrógeno atmosférico. Las bacterias que poseen esta capacidad fueron aquellas capaces de crecer en el medio Nf b (sin Nitrógeno). De las 50 cepas puras, sólo 10 fueron capaces de fijar N<sub>2</sub> (7 cepas de Santa Rosa y 3 cepas de Crucero), por lo tanto estas son las bacterias que se estudiaron.

**CUADRO 1. Sigla de identificación, respuesta a la tinción de Gram, morfología y lugar de aislamiento de cepas capaces de fijar nitrógeno atmosférico.**

Sigla de identificación	Tinción de Gram	Morfología	Lugar de aislamiento
JS c1	-	Bacilo	Santa Rosa
JS c4	-	Bacilo	Santa Rosa
JS c5	-	Bacilo	Santa Rosa
JS c6	+	Bacilo	Santa Rosa
JS c12	+	Bacilo	Santa Rosa
JS c24	+	Bacilo	Santa Rosa
JS c25	+	Bacilo	Santa Rosa
JS c26	+	Bacilo	Crucero
JS c90	-	Bacilo	Crucero
JS c91	-	Bacilo	Crucero

Se observa que todos los aislamientos presentan una morfología bacilar, esto se debe, a que las BFN presentan esta forma.

Con respecto a la tinción de Gram, en la rizósfera existen BFN Gram (+) como especies del género *Bacillus* y BFN Gram (-) como son los géneros: *Pseudomonas*, *Klebsiella*, etc.

#### 4.2 Producción de compuestos indólicos.

Para este fin, se usó como patrón el ácido indólicético (AIA). Se obtuvo la curva de calibración de éste, para así poder saber las cantidades producidas por las cepas bacterianas en estudio.

**CUADRO 2. Valores de absorbancia de distintas concentraciones en ppm, determinados para constituir la curva de calibración de AIA.**

Absorbancia	Concentración en ppm
0,000	0
0,087	3
0,168	12
0,518	18
0,644	26
1,103	40
1,139	50

En el Cuadro 2 se puede observar la absorbancia de las concentraciones de AIA que va desde 0 ppm hasta 50 ppm. Con estos valores se calculó la curva de calibración que resultó ser  $y=39,033x + 0,08825$

**CUADRO 3. Producción de compuestos indólicos de las cepas en estudio a través del tiempo (ppm).**

Cepa	Tiempo de incubación (horas)							
	20	25	42	45	49	65	70	73
JS c1	18,5	8,6	17,5	18,4	17,8	17,0	19,6	17,5
JS c4	21,5	28,0	20,3	20,2	21,3	18,7	18,6	20,3
JS c5	18,1	23,2	46,8	46,8	57,4	63,3	50,1	68,8
JS c6	20,5	25,0	31,3	18,8	22,9	18,0	19,3	21,9
JS c12	34,2	27,4	36,6	38,5	53,7	40,6	61,5	68,2
JS c20	16,8	25,5	16,2	21,8	20,8	18,0	20,0	19,1
JS c24		19,9	17,3	22,7	20,8	19,0	18,8	19,3
JS c25	20,5	22,9	19,3	20,6	31,6	32,2	19,4	19,7
JS c26	14,7	28,1	22,9	17,2	16,2	18,9		19,5
JS c90		21,0	19,0	20,9	18,3	18,4	19,9	20,0
JS c91	15,1	27,9	23,8	18,0	16,8	16,0	16,2	16,3
<i>Pantoea</i>	29,7	21,8	17,3	22,2	18,1	17,6	17,1	16,3
<i>Serratia</i>	20,3	31,6	28,6	30,4	20,1	21,0	29,7	24,6
<i>P. putida</i>	0,0	0,0	1,0	1,0	2,2	2,0	2,0	3,0

En el Cuadro 3 se muestra la producción de compuestos indólicos producidos por las cepas en estudio, estos valores se obtuvieron gracias a la curva de calibración del AIA (que se obtuvo con los valores del Cuadro 2) y con las absorbancias mostradas en el Anexo 3.

Se observa que las cepas JS c5 (*Klebsiella*) y JS c12 (*Bacillus*) fueron las que presentaron mayor capacidad productora de compuestos indólicos, también se aprecia que las cepas de estos 2 géneros mencionados produjeron más de estos compuestos que las cepas del género *Pseudomonas* (JS c90, JS c91)

También se ilustra la producción de fitohormonas de 3 cepas que se usaron como testigo para validar el método. De ellas, dos cepas que producen altos niveles de AIA (*Serratia* y *Pantoea*) y una que produce niveles bajos de fitohormonas (*P. putida*).



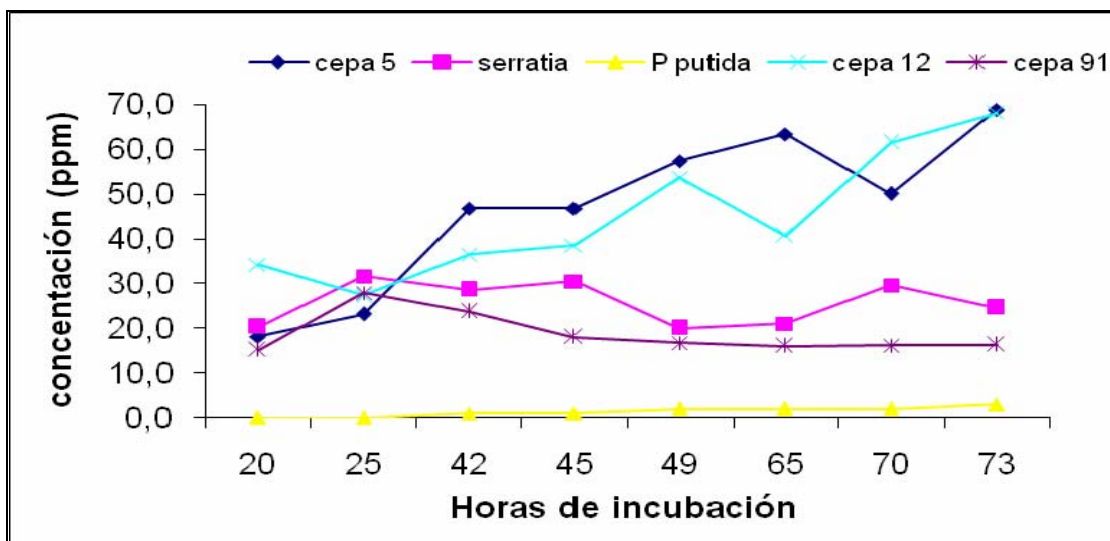
Se puede observar que las 10 cepas en estudio, al suplementarle triptófano fueron capaces de biosintetizar AIA. Estos resultados confirman los descritos por KHALID (2003) y MEHNAZ *et al.* (2001), quienes observaron que al suplementar con triptófano a las cepas en estudio, se produjo un aumento en la biosíntesis de AIA. Esto es explicado, debido, a que el triptófano agregado forma más Acido Indol Acetamida I y este a la vez forma más AIA.

Casi todas las cepas pertenecientes al género *Bacillus* (JS c6, JS c20, JS c24, JS c25 y JS c26) y las 2 cepas del género *Pseudomonas* (JS C90 y JS c91) produjeron niveles más bajos de AIA. Esto se puede explicar por que estos géneros son capaces de producir diversas sustancias, además de las fitohormonas.

Lo anterior es confirmado por CERVANTES (2001), donde encontró que estos géneros producen varios tipos de sustancias antifúngicas tales como: pirrolnitrina, pioluteorina y tropoloina.

TORRES *et al.*, (2000) considera al género *Pseudomonas* como un bajo productor de fitohormonas, debido, a que además produce otras sustancias como lo son los sideróforos.

Los antecedentes aportados en el Cuadro 3 referidos a las cepas JS c5, JS c12, JS c91 (*Pseudomonas*), *Serratia* y *P. putida*, fueron utilizados para confeccionar la Figura 1. En esta figura se aprecia que las cepas JS c5 (*Klebsiella*) y JS c12 (*Bacillus*) obtuvieron una mayor producción de AIA, ambas cepas van aumentando su producción a medida que aumenta su período de incubación.



**FIGURA 1. Curva de producción de compuestos indólicos de 3 cepas pertenecientes cada una a un género aislado y 2 cepas patrones.**

Así mismo, en la Figura 1, también se observa la producción en aumento de las cepas JS c5 y JS c12, desde la fase estacionaria en adelante. Estos resultados coinciden con los encontrados por KHAWAS y ADACHI (1999), quienes observaron que *K. pneumoniae* y *A. brasilensis* en esa fase produjeron altos niveles de AIA (35 y 45 ppm) y triptofol (38 y 42 ppm) respectivamente. Esto es debido, a que en esta fase se encuentran los microorganismos en una máxima concentración.

También se aprecia la producción más o menos constante de AIA de la cepa JS c91 (*Pseudomonas*), lo que es confirmado por TORRES *et al.*, (2000) donde las cepas pertenecientes a este género sólo produjeron como máximo 30 ppm de AIA.

Finalmente se ve la producción de una cepa productora de fitohormonas como es *Serratia* y la menor producción de una cepa que produce bajos niveles de AIA como es el caso de *P. putida*.

De acuerdo a los resultados mostrados para esta sección se observa que todas las cepas seleccionadas, fueron capaces de biosintetizar compuestos indólicos.

### 4.3 Identificación taxonómica de cepas seleccionadas.

Una vez realizada la determinación de FBN, en forma cualitativa y la medición de compuestos indólicos de las 10 cepas seleccionadas, se procedió a establecer su clasificación taxonómica a través de pruebas tintoriales, morfológicas y bioquímicas.

**4.3.1 Pruebas tintoriales y morfológicas.** La que representa a estas dos características es la prueba de gram, ya que con esta se puede saber si la bacteria es Gram (-) o Gram (+). Además, se puede ver también con la misma, la morfología que tiene la bacteria, es decir, si es bacilar o cocoide. También con ésta se puede ver la presencia de endospora, una característica importante para su identificación.

Otra prueba importante es la motilidad, ya que algunos grupos bacterianos se caracterizan por poseer flagelos, y otros que son inmóviles BERGEY (2002).

**CUADRO 4. Clasificación de las bacterias según, Gram, morfología celular, motilidad y presencia de endospora de las cepas seleccionadas como fijadoras de N<sub>2</sub>.**

Sigla de Identificación	Tinción de Gram	Morfología celular	Motilidad	Presencia de endospora
JS c1	g(-)	bacilo	Si	No
JS c4	g(-)	bacilo	Si	No
JS c5	g(-)	bacilo	Si	No
JS c6	g(+)	bacilo	Si	Si
JS c12	g(+)	bacilo	Si	Si
JS c24	g(+)	bacilo	Si	Si
JS c25	g(+)	bacilo	Si	Si
JS c26	g(+)	bacilo	Si	Si
JS c90	g(-)	bacilo	Si	No
JS c91	g(-)	bacilo	Si	No

En el Cuadro 4 se ve que existen cinco cepas Gram (+) y cinco cepas Gram (-). Además, se ve que todas las cepas presentan la forma bacilar, la cual es típica para

las bacterias que habitan en el suelo (ALEXANDER, 1961). Se apreciaba que todas presentan motilidad, y que las cinco cepas gram positivos presentan endospora.

**4.3.2 Pruebas bioquímicas.** Según DÖBEREINER (1997), en el ecosistema suelo se encuentra un gran número de bacterias con la capacidad de fijar nitrógeno de forma libre, y producir fitohormonas. Entre las más comunes, se encuentran especies pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y bacterias incluidas en la familia de las Enterobacterias. Debido a esto, es que se usaron estos géneros como patrones para ver si las cepas a identificar pertenecían a ellos.

4.3.2.1 Género *Bacillus*. Este género por poseer un gran número de especies es frecuente encontrarlo en la rizósfera de las plantas. Por esto, para confirmar si las cepas aisladas pertenecen a este género se realizaron más pruebas bioquímicas.

Las características comunes a este género son: su forma bacilar, gram positivo y presencia de endospora (BERGEY, 2002). Por esta razón, de las 10 cepas iniciales, 5 cepas presentan esta característica (Cuadro 4), por esto a éstas se le hicieron las pruebas bioquímicas para establecer si pertenecen al género *Bacillus*.

**CUADRO 5. Pruebas bioquímicas realizadas a 5 cepas bacterianas: JS c6, JS c12, JS c24, JS c25 y JS c26 para establecer su pertenencia al género *Bacillus*.**

Pruebas	Cepa JS c6	Cepa JS c12	Cepa JS c24	Cepa JS c25	Cepa JS c26
Urea	+	-	+	-	+
Citrato	+	+	+	+	+
Indol	-	-	-	-	-
Oxidasa	-	-	-	+	-
Catalasa	+	+	+	+	+
Red. NO <sub>3</sub>	+	+	+	+	+

En el Cuadro 5 se puede observar que las cepas JS c6, JS c12, JS c24, JS c25 y JS c26. Corresponden al género *Bacillus*, ya que coinciden con las características del

género, antes mencionadas, además, presentan características típicas como oxidasa negativa, catalasa positiva; pero se puede observar que estos aislamientos pertenecen a distintas especies del género *Bacillus*, por que difieren en las demás pruebas bioquímicas.

De las 10 cepas aisladas como fijadoras de nitrógeno se ve que el 50 % de éstas pertenecen al género *Bacillus*, esto se debe a que este género es muy abundante en el suelo, sin embargo DÖBEREINER y PEDROSA (1987) señalan, que este género presenta pocas especies con la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico.

4.3.2.2 Género *Pseudomonas*: Este género es muy abundante en la rizósfera, así para confirmar o descartar si pertenece a este género se utilizó como cepas patrones a *P. fluorescens* y *P. putida*.

**CUADRO 6. Pruebas bioquímicas realizadas a las cepas JS c1, JS c4, JS c5, JS c90 y JS c91 para establecer su pertenencia al género *Pseudomonas*.**

Pruebas	Cepa JS c1	Cepa JS c4	Cepa JS c5	Cepa JS c90	Cepa JS c91	<i>P.fluorescens</i>	<i>P.putida</i>
Prueba de la Oxidasa	-	-	-	+	+	+	+
Producción pigmentos en Agar F	-	-	-	+	+	+	-
Prod. pigmentos en Agar P	-	-	-	+	+	+	-
Producción pigmento en Agar Cetrimida	-	-	-	+	+	+	+
Crecimiento a 4 ° C	**	**	**	+	+	+	+
Crecimiento a 42 ° C	**	**	**	-	-	-	-
O/F	+/+	+/+	+/+	+/-	+/-	+/-	+/-
-Reducción de NO <sub>3</sub>	+	+	+	+	-	-	-

\*\* : No se realizó esa prueba, debido a que al no coincidir con las otras pruebas anteriores, se supo que no pertenecía al género.

En el Cuadro 6, al realizar las pruebas se puede ver que las cepas JS c1, JS c4 y JS c5 no pertenecen al género *Pseudomonas*.

Pero las cepas JS c90 y JS c91 coinciden con el género. Por lo que se acepta que estas cepas pertenecen al género *Pseudomonas*.

4.3.2.3 Enterobacterias: de acuerdo a SALANTUR *et al.*, (2006) y LOI RET *et al.*, (2004). Los géneros perteneciente a esta familia que comúnmente se encuentran asociado a la rizósfera y que son capaces de fijar nitrógeno atmosférico son: *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Pantoea*, etc. Para ver si las cepas por identificar pertenecen a esta familia se comparó con la bacteria patrón *Pantoea agglomerans*.

**CUADRO 7. Pruebas bioquímicas realizadas las cepas JS c1, JS c4 y JS c5 para establecer su pertenencia a la familia de las Enterobacterias.**

Pruebas	Cepa JS c1	Cepa JS c4	Cepa JS c5	<i>P. agglomerans</i>
Crecimiento en Agar	+	+	+	+
MacKONKEY				
Prueba de la Catalasa	+	+	+	+
Prueba de la Oxidasa	-	-	-	-
Utilización de la Urea	+	+	+	-
Citrato	+	+	+	+
TSI	A, A	A, A	A, A	A, A
Prod. H <sub>2</sub> S	+	+	+	+
Lisina descarboxilasa	+	+	+	-
O/F	+/+	+/+	+/+	+/+

En el Cuadro 7 se puede ver que las cepas JS c1, JS c4, JS c5, presentan características típicas de la familia de las Enterobacterias, como por ejemplo: oxidasa

negativa, catalasa positiva, realiza n oxidación y fermentación debido a, que son anaerobias facultativas, entre otras. También se puede ver que no pertenece a *P. agglomerans*. Para saber a las especies que corresponden estas cepas se requirieron de pruebas más específicas, ya que las anteriores, son pruebas que nos permiten ver si pertenecen a la familia de las Enterobacterias, pero no permiten saber con exactitud a que especie corresponden.

4.3.2.3.1 Pruebas de identificación bacteriana APi 20 E. Debido que las cepas anteriores corresponden a la familia de las Enterobacterias, se procedió a usar la prueba bioquímica de los microtubos deshidratados (APi 20 E), este kit es específico para esta familia.

Una vez realizada esta prueba se obtuvo que las 3 cepas pertenecen al género *Klebsiella*. La prueba dió como resultado que las cepas JS c1 y JS c5 pertenecen a la especie *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, esto se obtuvo con un 95% y un 93% de similitud respectivamente y finalmente la cepa JS c4 con un 95,6% de similitud da que pertenece a la especie *K. oxytoca*.

Estas tres especies perteneciente a este género, con la capacidad de realizar FBN concuerdan con los encontrados por GLICK (1995), quien encontró que *K. pneumoniae* era capaz de fijar nitrógeno y sintetizar fitohormonas y Sajjad *et al.*, (2001), citado por LOIRET *et al.*, (2004), donde observaron que cepas de *K. oxytoca* aisladas de la caña de azúcar fueron capaces de fijar nitrógeno.

Finalmente se pudo determinar que de las 10 cepas en estudio, 5 cepas corresponden al género *Bacillus*, tres al género *Klebsiella* y dos cepas al género *Pseudomonas*.

De acuerdo a los resultados anteriores se observa que 7 cepas pertenecen al grupo de bacterias rizo esféricas y 2 cepas pertenecen a bacterias en dófitas. Ambos grupos son fijadores de N<sub>2</sub> de vida libre.



#### 4.4 Recuento de Unidades formadoras de colonias en placas petri.

Esta se realizó para determinar la concentración de ufc por mL, del caldo peptona a densidad óptica de 0,6. Debido, que este medio de cultivo a la densidad óptica señalada anteriormente, se utilizó para producir las capsulas bacterianas, las cuales fueron inoculadas al trigo.

**CUADRO 8. Recuento de ufc de las cepas a densidad óptica de 0,6.**

Cepa	Género	Ufc/mL.
JS c1	<i>Klebsiella</i>	4,1*10 <sup>9</sup>
JS c4	<i>Klebsiella</i>	9,4* 10 <sup>8</sup>
JS c5	<i>Klebsiella</i>	3,6* 10 <sup>8</sup>
JS c6	<i>Bacillus</i>	1,4* 10 <sup>8</sup>
JS c12	<i>Bacillus</i>	7,7*10 <sup>7</sup>
JS c24	<i>Bacillus</i>	1,1*10 <sup>8</sup>
JS c25	<i>Bacillus</i>	2.3*10 <sup>8</sup>
JS c26	<i>Bacillus</i>	5,0*10 <sup>7</sup>
JS c90	<i>Pseudomonas</i>	6,8 *10 <sup>8</sup>
JS c91	<i>Pseudomonas</i>	1,4*10 <sup>8</sup>

En el Cuadro 8 se puede ver que la cepa JS c1 es la que presenta una mayor densidad, además se ve que las cepas perteneciente el género *Klebsiella*, junto con el género *Pseudomonas* presentan una mayor densidad que las cepas del género *Bacillus*.

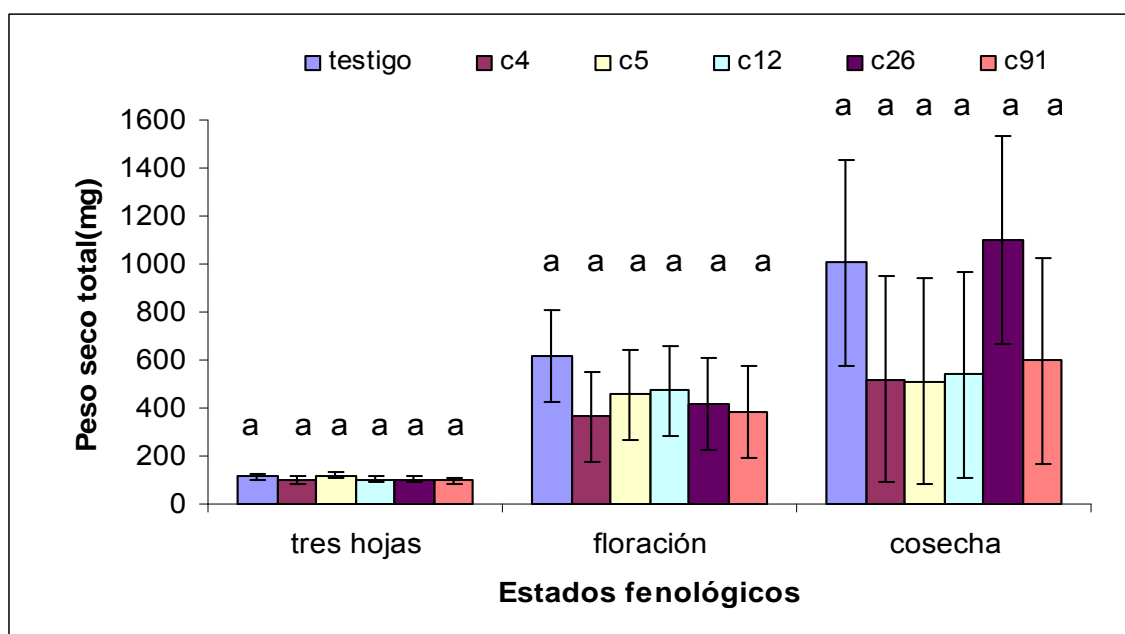
Estas densidades de crecimiento bacteriano, son típicas para densidades ópticas de 0,5 a 0,6. Esto es confirmado por KHALID *et al.*, (2004).

#### 4.5 Evaluación del efecto promotor en trigo de cinco cepas seleccionadas como fijadoras de N<sub>2</sub> y productoras de fitohormonas.

Se utilizó plantas pertenecientes a la especie vegetal del trigo, cultivar Pandora, se evaluó el efecto promotor de las cepas en tres estados fenológicos, correspondiente al estado de tres hojas, floración, y cosecha.

Se utilizaron 5 cepas productoras de compuestos indólicos las cuales son: JS c4, JS c5; JS c12, JS c26; y JS c91, pertenecientes a los géneros *Klebsiella*, *Bacillus* y *Pseudomonas* respectivamente.

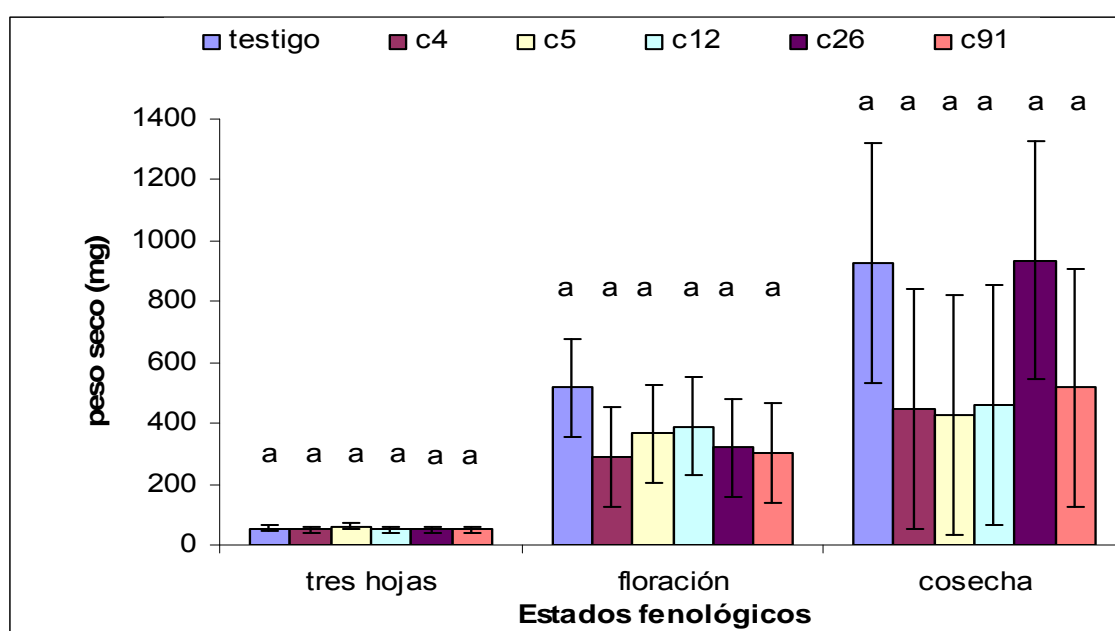
**4.5.1 Materia seca total.** Respuesta de los tratamientos sobre el peso seco total de la planta. Al medir este parámetro no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), en ninguno de los tres estados fenológicos analizados (Anexo 4)



**FIGURA 2** Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo, sobre el peso seco total en tres estados fenológicos. Diferentes letras sobre las barras DHS indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ; Tukey).

Este parámetro integra la acción productora de fitohormonas (longitud, área y diámetro radical; longitud de plantas) y la capacidad fijadora de nitrógeno de las cepas (macollos por superficie). La magnitud con que se promueve por parte de las cepas, los parámetros que influyen en estos dos efectos (producción de fitohormonas y FBN), va a repercutir directamente sobre la materia seca total.

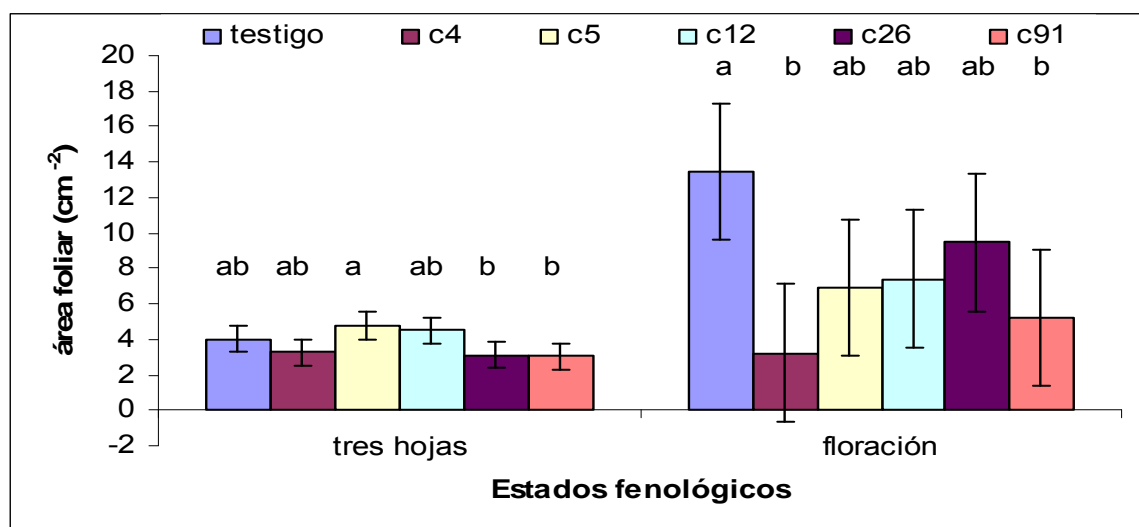
4.5.1.1 Materia seca aérea. Respuesta de los tratamientos sobre el peso seco aéreo. Al igual que en el parámetro anterior tampoco se presentaron diferencias significativas para los estados fenológicos analizados.



**FIGURA 3** Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo sobre el peso seco aéreo en los tres estados fenológicos. Diferentes letras sobre las barras DHS indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ; Tukey).

La ausencia de diferencias se debe a que este parámetro está determinado por varios componentes que se muestran posteriormente. En los cuales los tratamientos tienen resultados variables, presentando por ejemplo (tratamiento) en componente un valor alto y en otro un valor bajo, lo que hace que no existan diferencias de las cepas sobre el peso seco aéreo.

#### 4.5.1.1.1 Area foliar. Efecto de los tratamientos sobre el área foliar en los estados fenológicos de tres hojas y floración



**FIGURA 4** Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo, sobre el área foliar en los dos primeros estados fenológicos analizados. Diferentes letras sobre las barras DHS indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ; Tukey).

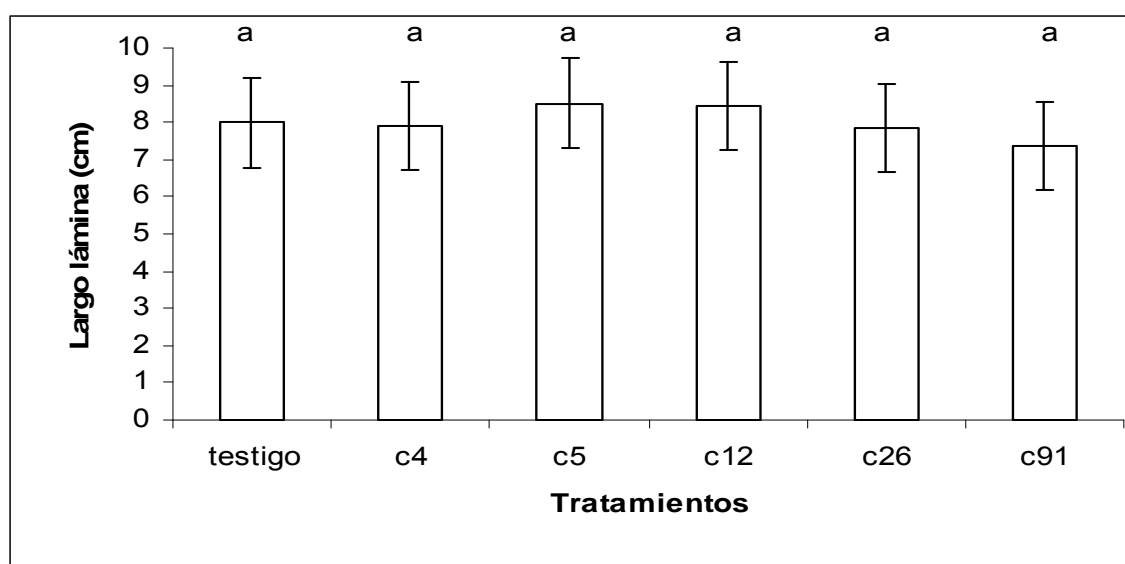
En la Figura 4 se observa, para el estado de tres hojas que el tratamiento JS c5 es el que presentó una mayor área foliar, la cual es significativa sobre las cepas JS c26 y JS c91, pero no sobre el testigo y las demás cepas (Anexo 5)

Además en esta figura se observa que en el estado de floración también se observaron diferencias significativas, se puede ver que los tratamientos con las cepas JS c4 y JS c91 fueron menores en forma significativa (Anexo 5)

Se puede apreciar que las cepas JS c4 y JS c91 en estado de floración con respecto al testigo produjeron un efecto inhibitorio, debido a que su área foliar es menor en forma significativa.

El área foliar en el estado de 3 hojas lograda por el tratamiento inoculado con las cepas JS c5 se debe a que éstas lograron una gran longitud y ancho de las láminas. De estos dos parámetros, la mayor longitud obtenida es la que más explica al área foliar, ya que presenta un  $R^2$  de 83,29% versus un 47,42% obtenida por el ancho de lámina, al correlacionarlas con el área foliar.

4.5.1.1.1 Largo de láminas. Efecto de las cepas sobre el largo de láminas en el estado de tres hojas.



**FIGURA 5** Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo, sobre el largo de láminas en el estado fenológico de tres hojas. Diferentes letras sobre las barras DHS indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ; Tukey).

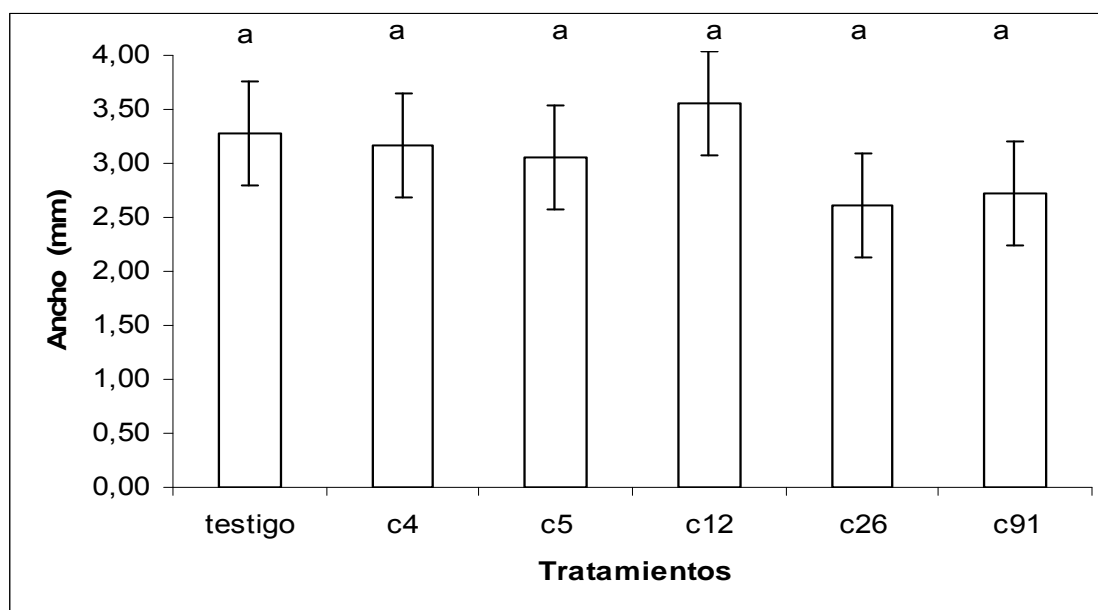
En la Figura 5, se observa que para este parámetro tampoco se ven diferencias significativas.

En este parámetro se esperaba que la mayor longitud de láminas de los tratamientos inoculados con las cepas bacterianas con respecto al testigo fuera significativa, debido a que éstas en condiciones *in vitro* fueron capaces de fijar  $N_2$  y

este elemento afecta positivamente sobre los parámetros de crecimiento de las plantas.

4.5.1.1.2 Ancho de láminas. Efecto de las cepas sobre el ancho de lámina en el estado de tres hojas.

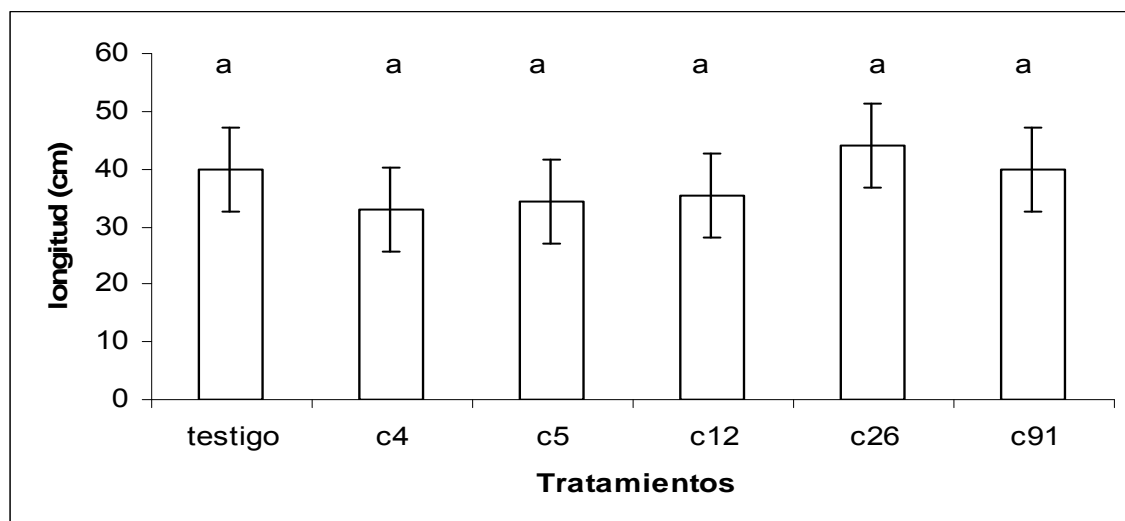
En la Figura 6 se observa para este parámetro que tampoco se encontraron diferencias significativas.



**FIGURA 6** Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo, sobre el ancho de láminas en el estado fenológico de tres hojas. Diferentes letras sobre la barras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ; Tukey).

Este parámetro es más parejo, es decir, las plantas no van a incrementar mayormente su ancho al tener una disponibilidad mayor de nutrientes. Es por eso que no se aprecian diferencias significativas.

4.5.1.1.2 Altura de plantas. Respuesta de los tratamientos sobre la altura final de las plantas



**FIGURA 7 Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo, sobre la altura final de las plantas. Diferentes letras sobre la barras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ; Tukey).**

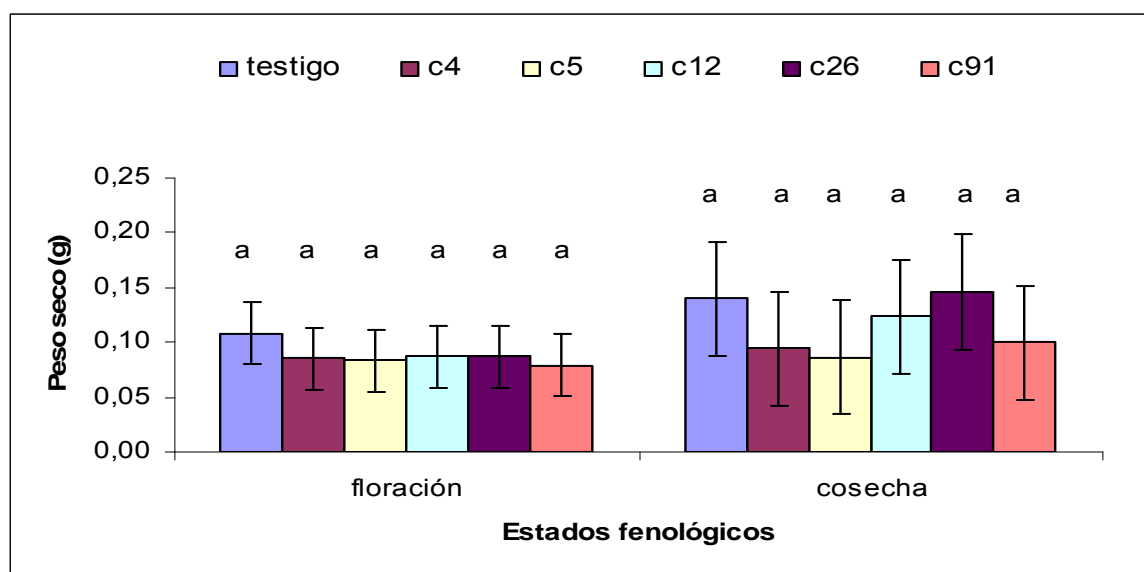
En la Figura 7, se ve que para el parámetro de altura de plantas no se produjeron diferencias significativas (Anexo 6). Esto se debió básicamente a que el tratamiento JS c26 y el testigo presentaron gran variación en los datos, ya que para el caso de la cepa JS c26 en casi todas las repeticiones presentaron valores superiores a 41 cm, excepto una repetición que presentó un valor de 35,44 cm siendo la media de 44,11 cm. Lo mismo ocurrió para el testigo, debido que casi todas las repeticiones presentaron valores menores a 39 cm, habiendo una repetición que presentó un valor de 55,18 cm, presentando una media de 39,87 cm. Todo esto hace que exista un gran desviación estándar para estos dos tratamientos haciendo que fluctúe la altura para el testigo entre 30 a 49 cm y para la cepa JS c26 de 37 a 51 (Anexo 7)

La altura de las plantas producida por la cepa JS c26 se atribuye a que fue capaz de producir fitohormonas, las cuales estimulan la elongación y división celular, tanto del tallo como de las raíces. Claro que esta elongación por parte de esta cepa no fue significativa debido a que la repetición 4 del testigo como se mencionó arriba presentó un gran valor de altura de plantas. Esta mayor altura se pudo deber a que el suelo de esta maceta tenía un contenido mayor de nitrógeno.

SALANTUR *et al* (2005), al inocular cebada con cepas pertenecientes al género *Bacillus*, observó que estas cepas promovieron la altura de las plantas versus el testigo que no poseía cepas.

ARKHIPOVA *et al.* (2006), dicen que además de producir fitohormonas como AIA, los microorganismos son capaces de sintetizar citoquininas. Estos autores observaron un incremento en la biomasa de los tallos de plantas de trigo, inoculadas con *Bacillus subtilis*, donde explican que este incremento se debería a la acumulación de citoquininas en las plantas inoculadas.

#### 4.5.1.1.3 Peso seco de espigas. Respuesta de los tratamientos sobre el peso seco de las espigas (sin grano)



**FIGURA 8** Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo, sobre el peso seco de las espigas en los dos últimos estados fenológicos. Diferentes letras sobre las barras DHS indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ; Tukey).

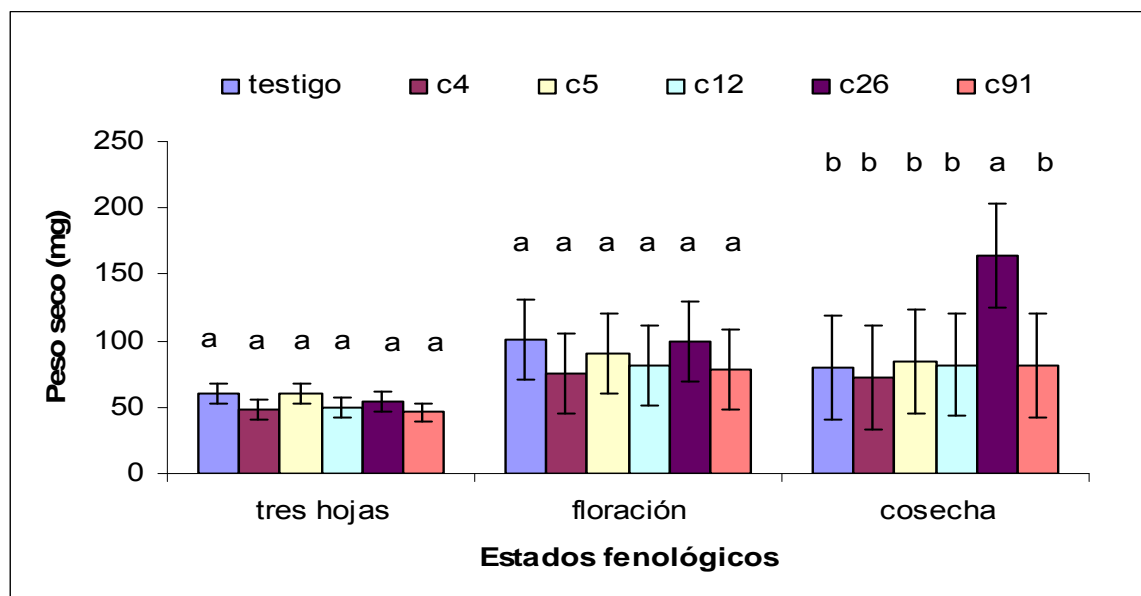
En este parámetro en los estados floración y de cosecha no se presentaron diferencias significativas (Figura 8).



SLAFER (2003) señala que al producirse un aumento en la elongación del tallo, resulta un incremento en el crecimiento del cultivo, lo que se traduce en espigas más grandes. Esto se explica debido a que las espigas se transforman en los destinos principales de fotoasimilados, es decir, después de la floración estos fotoasimilados son pasados a las espigas, antes de este estado existe una removilización de nutrientes, principalmente del tallo hacia las espigas, esto provoca una mayor fertilidad de flores, por consiguiente un mayor número de grano por espiguillas, provocando un aumento en el peso de las espigas. Esto se ve reflejado en el estado de grano, ya que la cepa JS c26, junto al testigo, obtuvieron tallos grandes lo que se ve reflejado en el peso de las estructuras de las espigas.

KIELO y KARI (1986) evaluaron los tallos y raíces de trigo y paja, después de 10 y 18 semanas de haber inoculado las plantas, éstas fueron analizadas separadamente, para medir la materia seca y contenido de N total, demostrándose que hasta un 33,8 % de N en los tallos de *P. pratensis* y un 15,9 % en *T. aestivum* fueron derivados de la fijación de N<sub>2</sub> de *K. pneumoniae*.

4.5.1.2 Peso seco radical. Respuesta de los tratamientos sobre el peso seco radical. Para este parámetro sólo se observaron diferencias significativas en el estado de cosecha (Anexo 8)



**FIGURA 9** Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo, sobre el peso seco radical en los tres estados fenológicos. Diferentes letras sobre las barras DHS indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ; Tukey).

En estado de cosecha, el tratamiento JS c26 es estadísticamente diferente a los demás tratamientos presentando un valor de 164 mg por raíz, superando al testigo en un 51,53 %, pero entre los demás tratamientos no se observan diferencias significativas.

El mayor valor de materia seca radical de esta cepa, se debe a la integración del efecto de ésta sobre la longitud y superficie radical. Esto es porque para estos dos subcomponentes esta cepa produjo un alto valor, pero en forma individual en estos subcomponentes su alto valor no fue significativo.

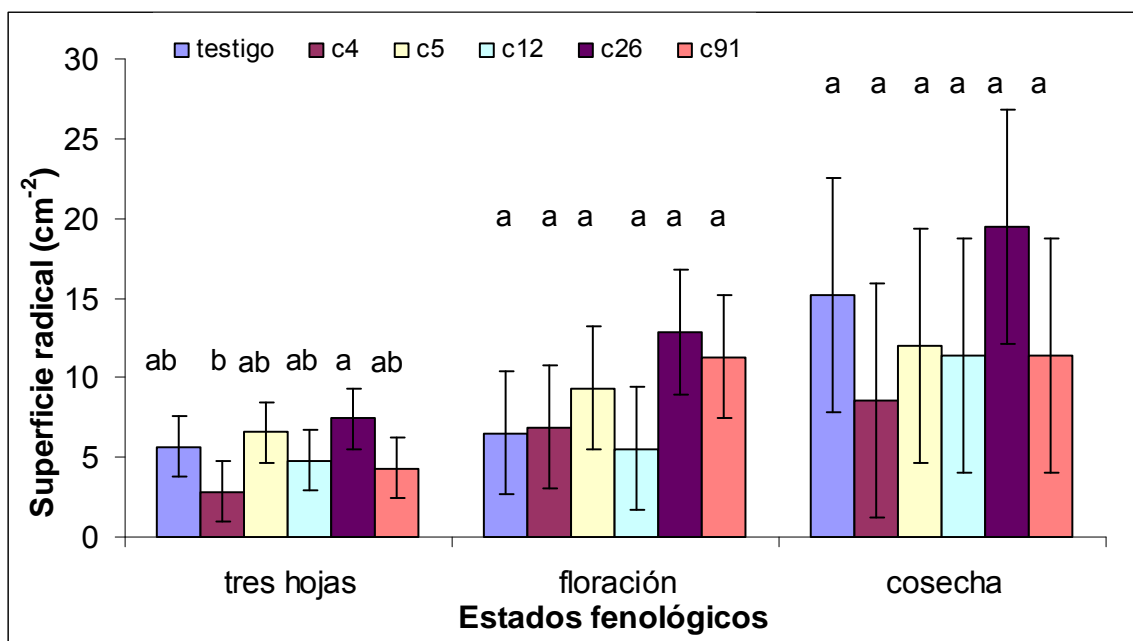
Esto comprobaría la capacidad productoras de fitohormonas de la cepa JS c26, ya que éstas ejercen efectos promotores principalmente sobre las raíces de las plantas, esto es confirmado por TORRES *et al* (2000).

Los resultados en este estado son similares a lo obtenido por EGAMBERDIYEVA *et al.* (sf), en el cual se observó que las cepas *Bacillus* spp. B10M y *Pseudomonas* spp. P29M produjeron diferencias significativas, donde la cepa *Pseudomonas* spp. P29M produjo un incremento del 75% sobre el testigo.

Este aumento del peso de raíces de plantas inoculadas con cepas promotoras de crecimiento, es confirmado por KHAWAS (1999), donde observó que plantas de arroz inoculadas con *Azospirillum* y *Klebsiella* promovieron la superficie y longitud radical, traduciéndose en un mayor peso seco de las raíces.

#### 4.5.1.2.1 Superficie radical. Respuesta de los tratamientos sobre la superficie radical.

En este parámetro se encontraron diferencias significativas (Anexo 9)



**FIGURA 10** Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo, sobre la superficie radical en los tres estados fenológicos. Diferentes letras sobre las barras DHS indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ; Tukey).

En la Figura 10, se puede ver para el estado de tres hojas que el tratamiento con la cepa JS c26, sólo superó estadísticamente a la cepa JS c4.

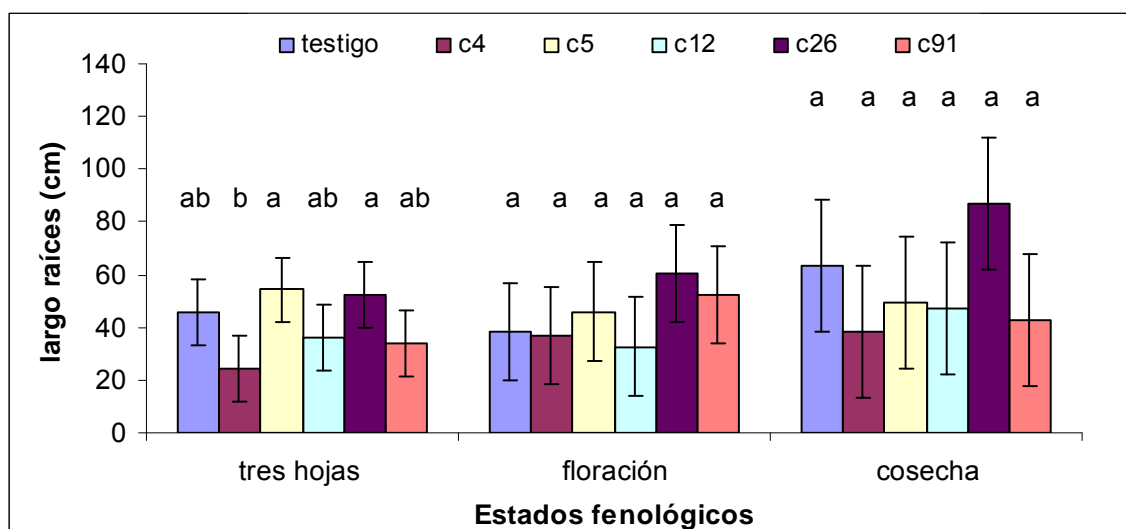
Además en esta figura se ve que en el estado de floración y cosecha no se presentaron diferencias significativas. Esto se debió a la variabilidad de datos (Anexo 10)

No se produjo diferencias significativas entre estos 2 tratamientos, porque al igual que en el parámetro de altura de plantas, la repetición 4 del testigo presentó un valor alto ( $33,41 \text{ cm}^2$ ) respecto a su media (gran variabilidad de datos). Así de esta manera no se registraron diferencias estadísticas. Nuevamente el gran valor de esta repetición se debería a que esa maceta debió contener mayor cantidad de nutrientes (nitrógeno).

Este parámetro junto con la longitud radical se esperaba que fueran incrementados de manera significativa, debido a una mayor proliferación de pelos radicales que mejoran la absorción de agua y de nutrientes (mayor área de exploración del suelo).

Lo anterior fue encontrado por KHALID *et al* (2004) y MADDONNI *et al* (2004). Además estos últimos autores sostienen que la acumulación incrementada de nitrógeno de las plantas de trigo inoculadas con *Azospirillum*, puede deberse a la acción de la enzima nitrato reductasa bacteriana, que aumenta la eficiencia de absorción de nitrato del suelo.

4.5.1.2.2 Longitud radical. Respuesta de los tratamientos sobre longitud radical, en los tres estados fenológicos analizados. Se encontraron diferencias significativas en el estado de tres hojas (Anexo11)



**FIGURA 11** Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo, sobre la longitud radical en los tres estados fenológicos. Diferentes letras sobre la barras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ; Tukey).

En la Figura 11 se observa que en el estado de tres hojas al igual que en el parámetro anterior la cepa JS c4 fue estadísticamente inferior a la cepa JS c5 y JS c26 pero comparada con los demás tratamientos no presentó diferencias significativas.

En los otros dos estados fenológicos analizados no se presentaron diferencias significativas, debido a la gran variación de datos (Anexo 12).

Nuevamente la repetición 4 del testigo es superior a la media (es el doble de la media con un valor de 126,03 cm) produciendo una gran desviación estándar, evitando así que se aprecie una diferencia significativa de la cepa JS c26 respecto a éste.

De la misma forma que en el parámetro anterior se esperaba un efecto promotor significativo debido a que las cepas fueron capaces de producir altos niveles de fitohormonas en condiciones *in vitro*.

Según SAL ANTUR *et al* (2005) estas fito hormonas producen una mayor elongación de raíces, un mayor número de raíces secundarias y un mayor número de pelos radicales. Todo esto hace que la longitud radical total sea mayor.

EGAMBERDIYEVA *et al* (sf) obtuvieron resultados donde observaron que cepas promotoras del crecimiento produjeron un aumento en el largo radical de 5 a 43 % sobre el testigo.

KHAWAS y ADACHI (1999), explican que esta mayor elongación se debe, básicamente a un mayor desarrollo de raíces laterales y pelos radicales, esto es debido a la acción de fitohormonas como el AIA.

4.5.1.2.2 Diámetro radical. Respuesta de los tratamientos sobre longitud radical, para los tres estado fenológicos analizados.

**CUADRO 9 Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo, sobre el diámetro radical en los tres estados fenológicos**

Tratamientos	Tres hojas	Floración	Grano
Testigo	0,4000 a	0,5538 a	0,7500 a
JS c4	0,3758 a	0,5874 a	0,6978 a
JS c5	0,3876 a	0,6142 a	0,7417 a
JS c12	0,4268 a	0,5498 a	0,7408 a
JS c26	0,4178 a	0,6702 a	0,7076 a
JS c90	0,4124 a	0,7052 a	0,6738 a

Diferentes letras en las columnas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ; Tukey)

En el Cuadro 9 se muestran los valores de diámetro radical en los tres estados fenológicos. En ningún de estos estados se observaron diferencias significativas.

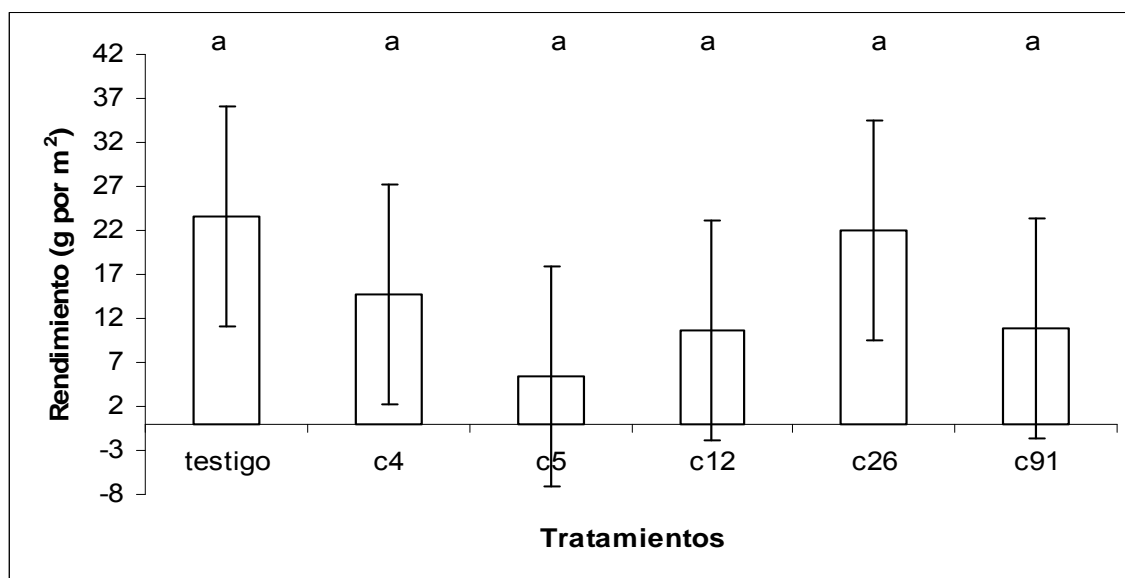
Este parámetro al igual que el ancho de láminas es más constante, esto se debe, a que por ejemplo al haber sustancias promotoras del crecimiento, en general habría una mayor longitud radical o puede haber una mayor superficie radical, es

decir, este parámetro no experimenta mayores cambios, como los otros dos antes mencionados (longitud y superficie radical).

**4.5.2 Rendimiento del trigo inoculado con las cepas bacterianas promotoras del crecimiento.** Este está conformado desde el punto de vista agronómico por 2 componentes que son: número de granos por una determinada superficie y peso individual de los granos. Por lo tanto éste es difícil de predecir, debido, a que el componente número de granos por superficie es muy complejo.

Además que existen relaciones negativas entre distintos componentes o subcomponentes numéricos del rendimiento lo que dificulta el análisis del rendimiento en función de un único parámetro.

Estas relaciones negativas se debe a que existe una compensación entre los distintos subcomponentes del rendimiento CARCOVA *et al.*, (2003). Esta compensación es explicada por SLAFER y SAVIN (2006), como un feedback, es decir, si por ejemplo se produce un aumento en el número de macollos por  $m^2$ , esto trae como consecuencia una disminución en el número de macollos por plantas.

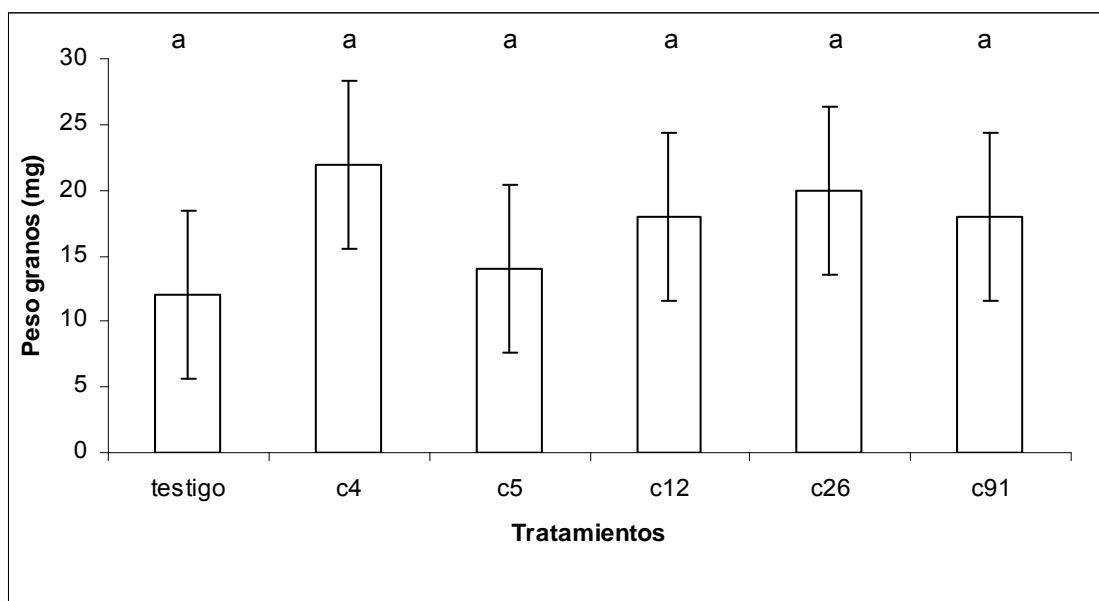


**FIGURA 12** Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo, sobre el rendimiento (gramos por  $m^2$ ). Diferentes letras sobre la barras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ; Tukey).

En la Figura 12 se observa que no se presentaron diferencias significativas para el rendimiento (Anexo 13) debido a la gran variación del componente del rendimiento de número de granos.

#### 4.5.2.1 Peso individual de los granos. Respuesta de los tratamientos sobre el peso de los granos.

Este componente numérico del rendimiento es el último en ser determinado y es reflejo de cuán rápido y durante cuánto tiempo crecieron los granos. El peso de los granos se define en una etapa acotada del ciclo. Esta etapa, está comprendida entre floración y la madurez fisiológica del cultivo.



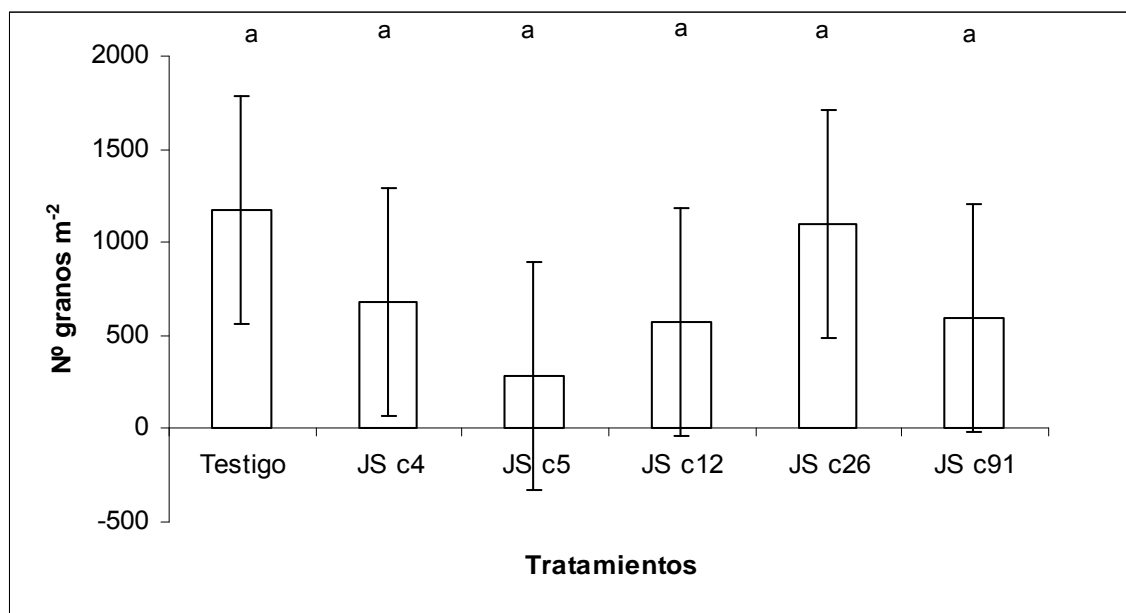
**FIGURA 13** Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo, sobre el peso seco individual de los granos. Diferentes letras sobre la barras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ; Tukey).

En la Figura 13 se aprecia que no se observaron diferencias significativas



Esto se debe a lo explicado por SLAFER (2003), quien señala que la diferencia existente en el peso de los granos es muy pequeña, ya que después de fijado los granos éstos no experimentan una mayor competencia por los fotoasimilados.

#### 4.5.2.2 Granos por m<sup>2</sup>. Respuesta de los tratamientos sobre el número de granos por m<sup>2</sup>.



**FIGURA 14 Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo, sobre el número de granos por m<sup>2</sup>. Diferentes letras sobre la barras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ; Tukey).**

En este componente del rendimiento, no se encontraron diferencias significativas (Anexo 14). Debido a que este componente del rendimiento presentó gran variación entre repeticiones y entre tratamientos, como se puede observar en el Anexo 15 que la repetición 3 del testigo y la repetición 4 de la cepa JS c5 las plantas produjeron espigas, pero éstas no produjeron granos. Se puede decir que de acuerdo a esto, por alguna razón estos tratamientos tuvieron una baja fertilidad de flores.

De los dos componentes numéricos del rendimiento (números de grano por metro cuadrado y peso individual de los granos) el que más explica el rendimiento es el

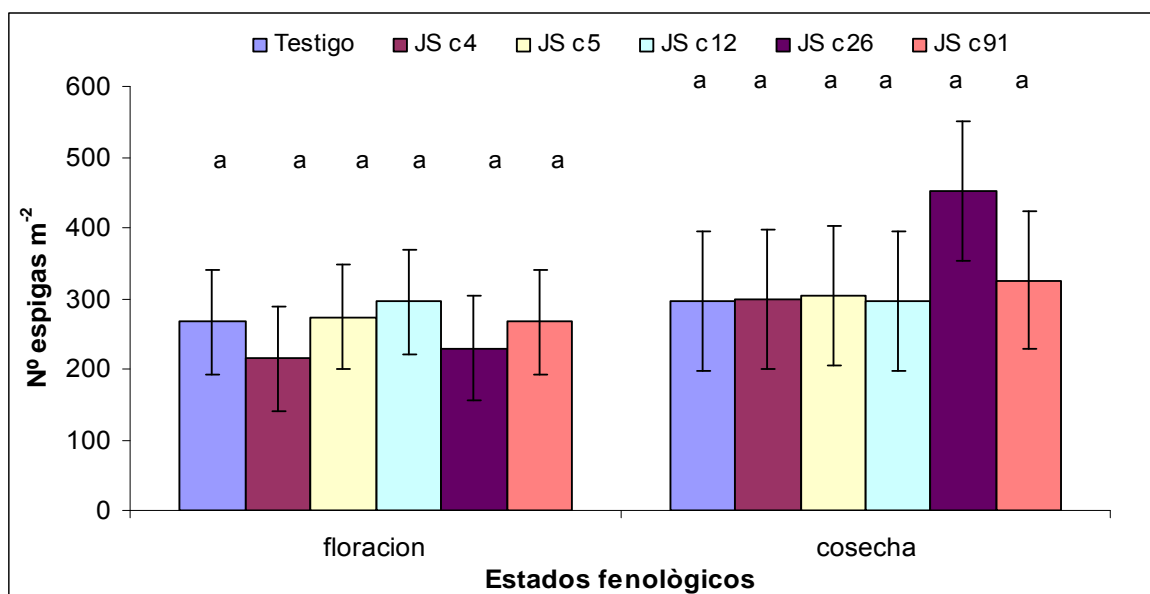
número de granos por superficie. Esto se debe según SLAFER *et al* (2004) , a que este componente es complejo y variable, debido que éste involucra varios subcomponentes y éstos en etapas tempranas de la ontogenia del cultivo, comienzan a establecerse, así una vez establecido el “stand” de plántulas, queda definido el número de plantas por  $m^2$ . Después en la floración queda definido el número de vástagos fértiles (número de espigas por  $m^2$ ). A la vez el número de grano por espiga está conformado por el número de espiguillas por espigas y el número de grano por espiguillas.

El número de granos por  $m^2$  obtenido s por el testigo, se debe fundamentalmente a que presentó un valor alto para el número de granos por espigas (Anexo 16), lo que hace que el número de granos por planta sea mayor.

Para la cepa JS c26 su valor se explica porque presentó un alto número de granos por planta (Anexo 16). Este valor, es debido a que presentó un gran número de espigas por planta y también a que fue capaz de presentar un valor alto de granos por espigas.

No se presentaron resultados esperados, como lo encontrados por SALANTUR *et al.* (2005) quienes obtuvieron valores altos para este componente, al inocular con rizobacterias semillas de cebada (*Hordeum vulgare*), esto se debió a que las cepas fueron capaces de producir un mayor número de espigas por  $m^2$  y un mayor número de granos por espiga.

4.5.2.2.1 Espigas por  $m^2$ . Respuesta de los tratamientos sobre el número de espigas por  $m^2$ .



**FIGURA 15** Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo, sobre el número de espigas por m<sup>2</sup>. Diferentes letras sobre la barras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ; Tukey).

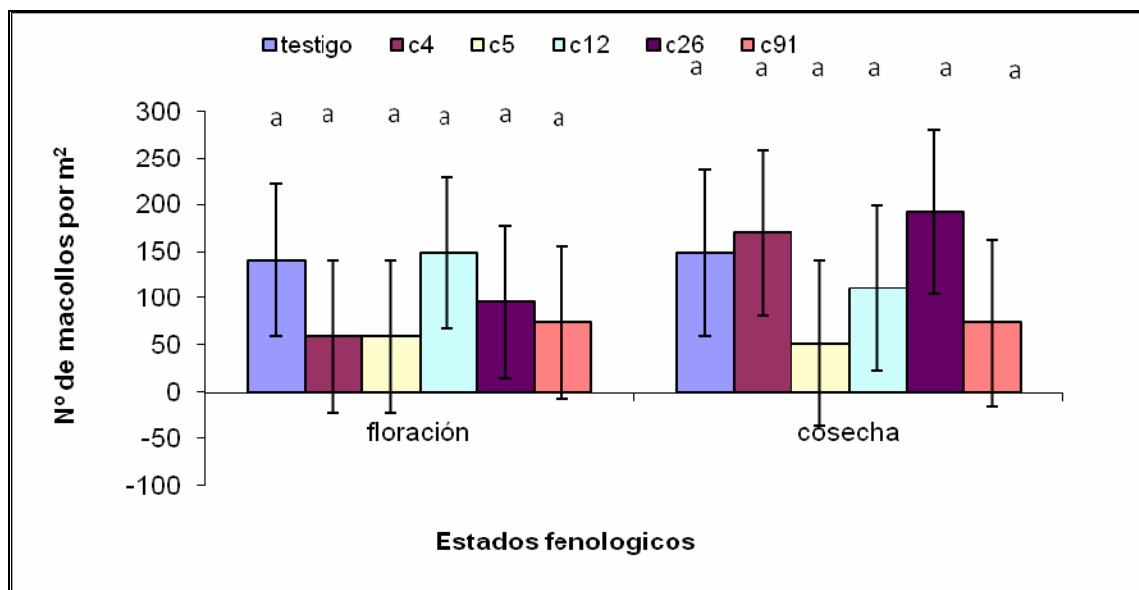
En este subcomponente del rendimiento, no se encontraron diferencias significativas (Figura 15).

Los valores más altos en floración del tratamiento inoculado con la cepa JS c12, se debe a su gran número de macollos por m<sup>2</sup>, lo que asegura mayores sitios potenciales de estructura reproductivas (espigas).

El alto valor de JS c26 en el estado de cosecha se explica, debido a que éste presentó un alto número de macollos por m<sup>2</sup> y un alto número de espigas por planta.

Similares resultados obtuvieron SALANTUR *et al.* (2005), donde rizobacterias incrementaron significativamente el número de espigas por m<sup>2</sup> entre un 11 a 17,4 % comparado con el testigo.

4.5.2.2.1.1 Números de macollos por m<sup>2</sup>. Respuesta de los tratamientos sobre el número de macollos por metro cuadrado.



**Figura 16 Efecto de las cepas JS c4, JS c5, JS c12, JS c26 y JS c91 versus el testigo sobre el número de macollos por m<sup>2</sup> en dos estados fenológicos. Diferentes letras sobre la barras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ; Tukey).**

En la Figura 16 se ve que no se presentaron diferencias significativas. Esto se debió para el estado de cosecha al igual que para las variables de longitud de plantas, superficie y longitud radical la repetición 4 del testigo presentó un valor superior a su media produciendo así una gran desviación estándar.

Al igual que para la longitud de láminas, se esperaba que las cepas hubieran presentado en forma significativa un mayor número de macollos por m<sup>2</sup>, debido a la mayor disponibilidad de N por partes de las cepas.

## 5 CONCLUSIONES

De un total de 50 aislamientos, sólo 10 fueron capaces de desarrollarse en el medio NFb (deficiente de Nitrógeno), es decir, éstos presentaron la capacidad de fijar el N<sub>2</sub>.

Todas las cepas seleccionadas ( 10 cepas), fueron capaces de producir fitohormonas, destacándose la elevada producción de las cepas JS c5 (*Klebsiella*) y JS c12 (*Bacillus*).

Las 10 cepas fijadoras de N<sub>2</sub> pertenecen a tres géneros, los cuales se clasificaron como: 3 cepas en *Klebsiella*, 2 cepas en *Pseudomonas* y 5 cepas en *Bacillus*.

En general el crecimiento del trigo causado por las cepas no fue capaz de superar al testigo en forma significativa, salvo la cepa JS c26 que sólo en el estado de cosecha obtuvo un mayor peso seco radical.

En los parámetros longitud de plantas, superficie y longitud radical, número de macollos por metro cuadrado la diferencia (significativa) por parte de la cepa JS c26 con respecto al testigo no se observó, debido a que una repetición del testigo presentó un valor mucho mayor que la media.

Finalmente, las cepas aisladas fueron capaces de fijar nitrógeno atmosférico en condiciones *in vitro*, pero no en condiciones de macetas.

## 6 RESUMEN

El cultivo de trigo es uno de más importante para el país, debido a la alta superficie sembrada y principalmente a su elevada demanda. Para obtener un alto rendimiento se debe aplicar una dosis elevada de fertilizantes, originando problemas de contaminación, debido a que este nutriente es muy móvil en el suelo. Frente a esta realidad, es que cada vez se busca alternativas más sustentables y menos contaminantes con el medio ambiente. Una de éstas es la utilización de microorganismos fijadoras de nitrógeno (BFN) y productoras de fitohormonas. Estas bacterias que ejercen una acción benéfica son conocidas como PGPR (Plant growth-promoting rhizobacteria)

El objetivo general de este trabajo fue: aislar, identificar y evaluar la acción promotora del crecimiento vegetal de cepas bacterianas obtenidas desde y la rizósfera de *Rubus constrictus*, en plantas de trigo (*Triticum aestivum*) variedad Pandora.

Para lograr los objetivos propuestos se realizó una serie de aislamiento con las cuales se determinó su capacidad de fijar nitrógeno en forma cualitativa. Para esto se utilizó un medio de cultivo deficiente en este elemento (caldo NFb). Sólo las cepas que fueron capaces de crecer en éste, fueron seleccionadas.

Posteriormente se les determinó su capacidad de producir fitohormonas, para esto se utilizó como patrón al ácido indolacético (AIA). Finalmente todas las cepas fueron clasificadas taxonómicamente.

Cinco cepas fueron seleccionadas para evaluar su acción promotora de crecimiento y se compararon con un testigo sin bacterias, estas cepas se inocularon en semilla de trigo, el cuál fue sembrado y evaluadas en macetas.

El efecto benéfico de las bacterias se analizó en tres estados fenológicos (tres hojas, floración y grano). Las macetas fueron dispuestas al aire libre y sus resultados se analizaron en un diseño completo al azar con cinco repeticiones.

En términos generales las cepas no fueron capaces de promover los parámetros de crecimiento en plantas de trigo en forma significativa. Sin embargo en condiciones *in vitro* fueron capaces de fijar nitrógeno atmosférico y producir fitohormonas.

## SUMMARY

Wheat crop is one of the most important activities for our country, its demands a high surface and also shows a high demand. In order to get a high yield it must be applied a large fertilizer amount, process that causes pollution problems, because to the high mobility of this element in the soil. To face this reality, each time new alternatives are undergoing that search sustainability and less environmental contamination. One solution is the use of free nitrogen fixing microorganisms (BFN) and plant hormones producers. These bacteria exert a beneficial action to plants are known as PGPR (Plant growth-promoting rhizobacteria).

The general objective of this research was the isolation, identification, and evaluation of the promoting effect on growth on plants of selected bacterial strains isolated from the rhizosphere of *Rubus constrictus* (blackberry) and wheat (*Triticum aestivum*) cultivar Pandora plants.

To achieve the objectives several isolations were conducted and a collection of isolates gathered. It was determined their capacity to fix nitrogen qualitatively. For this purpose a free nitrogen medium was used (broth NFb). Only the isolates capable of grow were selected for further studies.

Also were determined the capacity to biosynthesize plant hormones like substances. For this purpose it was used indole acetic acid (IAA) as reference. Finally all the strains were taxonomically identified.

Five isolates were selected to evaluate their promoting action on wheat plants. Controls without bacteria were also used. The strains were inoculated to wheat seeds, them planted in pots and evaluated in different periods.



The beneficial effect of the strains was analyzed after three growth stages of wheat plants (three leaves, flowering and soft grain). The pots were placed on the ground directly to the environment and the results were statistically analyzed with a complete randomized design with five repetitions.

In general terms that the selected strains not were capable to promote growth parameters in plants of wheat significantly. But in conditions *in vitro* were able to fix atmospheric nitrogen and produce phytohormones.

## 7 BIBLIOGRAFIA

- ALEXANDER, M. 1961. Introduction to soil microbiology. 3<sup>a</sup> ed. John Wiley and sons. New York, USA. 472pp.
- ARKHIPOVA, T; VESELOV, S; MELENT, A; MARTYNENKO, E y KUDOY AROVA, G. 2006. Comparasion of Effects of Bacterials Strains Differing in Their Ability to Synthesizen Cytokinins on Growth and Cytokinin Content in Wheat Plants. Russian Journal of Plant Physiology. 53;507-513.
- BACA, B; SOTO, L y PARDO, M. 2000. fijación biológica de nitrógeno. Elementos. 38:43-49.
- BERGEY. 2002. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9 ed. Editado por John .G. Halt. New York, USA. 729 pp.
- BHATTARAI, T y HESS, D. 1993. Yield of Nepalese spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to inoculation with *Azospirillum* spp. of Nepalese origin. Plant and Soil. 151:67-76.
- BROWN, M; BURLINGHAM, S y JACKSON, R. 1974. Studies on *Azotobacter* species in soil. III. Effect of artificial inoculation on crop yields. Plant Soil 20: 194-214.
- CARCOVA, C; ABELEDO, G y LOPEZ, M. 2003. Análisis de la generación del Rendimiento: Crecimiento, partición y componentes. p 75-100. *In*: Producción de granos bases fundamentales para su manejo. Facultad de agronomía, Universidad de buenos Aires. Argentina.
- CERVANTES, M. 2001. Ciclo de l nitrógeno. Biblioteca virtual. San Pablo. 5 5pp. <http://cervantesvirtual.com>.

- DÖBEREINER, J. 1997. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. *Soil Biol. Biochem.* 29:771-774.
- DÖBEREINER, J., MARRIEL, I. E. y NERY, M. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Manual of determinative Bacteriology*. Williams y Wilkins. Estados Unidos. pp 40-42.
- DÖBEREINER, J y PEDROSA, M. 1987. Nitrogen-fixing Bacteria in Nonleguminous Crop Plants. University of Wisconsin- Madison. USA. 155p.
- EGAMBERDIYEVA, D; JURAEVA, D; YULDASHEVA, H y DAVRANOV, K. (s/f). The use of plant growth promoting bacteria for improve ment the plant growth of wheat, maize and cotton in calcareous soil of Uzbekistan. Institute of Microbiology, Uzbek Academy of Sciences.
- ESASHI, Y. Ethylene and seed germination, In: MATT O, A.K.; SUT TLE, J.C. (Ed.) *The plant hormone ethylene*. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.133-157.
- GLICK, B. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal Microbial* 41:109-117.
- KHALID, A; ARSHAD, M y Z AHIR, A, 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*. 96: 473-480.
- KHAWAS, H y ADACHI, K. 1999. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. *Biol Fertil Soils*. 28:377-381.

- KIELO, H y KARI, K. 1986. The role of root-associated *Klebsiella pneumoniae* in the nitrogen nutrition of *Poa pratensis* and *Triticum aestivum* as estimated by the method of <sup>15</sup>N isotope dilution. *Plant and Soil*. 90:245-254.
- LOIRET, F; ORTEGA, E; KLEINER, D; ORTEGA, P; RODES, R y DONG, Z. 2004. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. From sugarcane. *Journal of Applied Microbiology*. 97: 504-511.
- MAYZ-FIGUEROA, J. 2004. Fijación biológica de nitrógeno. *Revista científica UDO Agrícola*. 4 (1): 1-20.
- MEHNAZ, S; SAJJAD, M; HAURAL, L; BALLY, R; NORMAND, P; BANNO, A y MALIK, A. 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice. *Can. J. Microbiol.* 47: 110-117.
- MILLET, E y FELDMAN, M. 1984. Yield response of a common spring wheat cultivar to inoculation with *Azospirillum brasilense* at various levels of nitrogen fertilization. *Plant and Soil*. 80:255-259.
- MIRALLES, D; WINDAUER, L y GOMEZ, N. 2004. Factores que regulan el desarrollo de los cultivos de granos. pp 61-74. *In: Producción de granos básicos fundamentales para su manejo*. Facultad de agronomía, Universidad de Buenos Aires. Argentina.
- MUÑOZ, J y CABALLERO, J. 2002. *Gluconobacter diazotrophicus*, modelo de bacteria endófito. Programa de ecología Molecular y Microbiana, Centro de Investigación sobre fijación de nitrógeno. Editorial. Universidad Autónoma de México. México. pp. 1-19.
- OLIVARES, P. 2006. Fijación Biológica de nitrógeno. Estación Experimental del Zaidin. Granada. <http://sic.es.htm>.

- REDONDO-NIETO, 2006. Fijación biológica del nitrógeno. <http://www.am.es/personal-ciencias/fijaciónN.htm>
- SAHIN, F; CAKMAKCI, R y KANTAR, F. 2004. Sugar beet and barley in relation to inoculation with N<sub>2</sub>-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant and Soil*. 265: 123-129.
- SALANTUR, A; OZTURK, A; AKTEN, S; SAHIN, F y DONMEZ, F. 2005. Effect of inoculation with non-indigenous and indigenous rhizobacteria of Erzurum (Turkey) origin on growth and yield of spring barley. *Plant and Soil*. 275: 147-156.
- SALANTUR, A; OZTURK, A y AKTEN, S. 2006. Growth and yield response of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) to inoculation with rhizobacteria. *Plant Soil Environment*. 52: 111-118.
- SLAFER, G. 2003. Genetic basis of yield as viewed from a crop physiologist's perspective. *Ann. Appl. Biol.* 142: 117-128
- SLAFER, G; MIRALLES, D; SAVIN, R; WHITECHURCH, E y GONZALES, R. 2004. Ciclo Ontogénico, dinámica del desarrollo y generación del rendimiento y la calidad en trigo. p 101-134. *In: Producción de granos bases fundamentales para su manejo*. Facultad de agronomía, Universidad de Buenos Aires. Argentina.
- SLAFER, G y SAVIN, R. 2006. Physiology of Crop Yield. *Crop Physiology*.
- STREICHER, S; GURNEY, E y RAYMOND, V. 1971. Translation of Nitrogen-Fixation Genes in *Klebsiella pneumoniae* Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 68:1174-1177.
- SWEDRZYNSKA, D. 2000. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on Development and Yielding of Winter Wheat and Oat under Different Cultivation Conditions. *Polish Journal of Environmental Studies*. 9: 423-428.

- SWEDRZYNSKA, D y SAWICKA, A. 2001. Effect of Inoculation on Population Numbers of *Azospirillum* Bacteria under Winter Wheat, Oat and Maize. Polish Journal of Environmental Studies. 10: 21-25.
- TORRES, M; VALENCIA, A; BERNAL, J y MARTINEZ, P. 2000. Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter* sp and *Pseudomonas* sp., Producers of Indole-3-Acetic Acid and Siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere. Revista Latinoamericana de Microbiología. 42: 171-176.
- VESSEY, J; PAWLOWSKI, K y BERGMAN, B. 2005. Root-based N<sub>2</sub>-fixing symbioses: Legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp. and cycads. Plant and Soil. 274:51-78.
- XIE, Z; DOU, Y; PING, S; CHEN, M; WANG, G; ELMERICH, C y LIN, M. 2006. Nitrogen-Fixing *Pseudomonas stutzeri* A 1501. Biotechnology Research Institute, CAAS, Beijing, PR China e Institut des Sciences du Végétal. France.

ANEXOS

**Anexo 1 Composición caldo de cultivo NFb.**Caldo de cultivo selectivo para aislar bacterias fijadoras de N<sub>2</sub>.

Reactivo	Cantidad	(g/L)
Ácido málico	5,0	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5	
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O		0,2
NaCl	0,1	
CaCl <sub>2</sub>	0,02	
Solución de micronutrientes		2ml
Azul de bromotimol		sol 0,5%
en KOH 0,2 N		2 mL
Fe EDTA sol 1,64%		4 mL
KOH		4,5
Solución vitamínica	1	mL

**Anexo 2 Análisis del suelo usado en las macetas.**

<b>PH</b> en agua	(1:2,5)	5,4
<b>PH</b> CaCl <sub>2</sub> 0,01 M	(1:2,5)	4,6
<b>Materia orgánica</b>	(%)	14,0
<b>N- Mineral</b> (N-NO <sub>3</sub> +NH <sub>4</sub> )	(mg/kg)	31,5
<b>Fósforo</b> Olsen	(mg/kg)	11,7
<b>Potasio</b> intercambiable	(mg/kg)	239
<b>Sodio</b> intercambiable	(cmol+/kg)	0,10
<b>Calcio</b> intercambiable	(cmol+/kg)	0,90
<b>Magnesio</b> intercambiable	(cmol+/kg)	0,26
<b>Suma de bases</b>	(cmol+/kg)	1,87
<b>Aluminio</b> intercambiable	(cmol+/kg)	0,42
<b>CICE</b>	(cmol+/kg)	2,29
<b>Saturación de Al</b>	(%)	18,4



**Anexo 3 Valores de absorbancia a distintas horas de incubación para determinar las concentraciones en ppm de AIA.**

Cepa	Tiempo de incubación (horas)							
	20	25	42	45	49	65	70	73
JS c1	0,452	0,198	0,426	0,448	0,433	0,414	0,479	0,426
JS c4	0,527	0,694	0,498	0,494	0,522	0,456	0,461	0,497
JS c5	0,442	0,572	1,177	1,176	1,449	1,600	1,261	1,739
JS c6	0,503	0,617	0,779	0,458	0,564	0,439	0,472	0,539
JS c12	0,853	0,679	0,914	0,965	1,353	1,017	1,553	1,724
JS c20	0,408	0,631	0,392	0,536	0,511	0,439	0,489	0,467
JS c24		0,486	0,420	0,560	0,509	0,464	0,458	0,473
JS c25	0,502	0,564	0,473	0,505	0,786	0,802	0,475	0,483
JS c26	0,355	0,698	0,565	0,417	0,393	0,462		0,476
JS c90		0,516	0,464	0,512	0,447	0,448	0,486	0,489
JS c91	0,365	0,693	0,587	0,439	0,407	0,388	0,392	0,395
<i>Pantoea</i>	0,739	0,535	0,420	0,545	0,440	0,428	0,416	0,394
<i>Serratia</i>	0,497	0,786	0,711	0,757	0,492	0,515	0,738	0,608
<i>P. putida</i>	0,000	0,000	0,005	0,005	0,030	0,032	0,029	0,053

**Anexo 4 Análisis de varianza del parámetro de materia seca total para los tres estados fenológicos analizados.**

Tres hojas	Fuente	Sumas de cuadrados	GL	Cuadrado medios	F-Cal	P-Valor
	Entre grupos	0,00224	5	0,000488	2,20	0,0873
	Intra grupos	0,00488	24	0,00020		
	Total	0,00712	29			
Floración	Entre grupos	0,209902	5	0,0419804	1,12	0,3784
	Intra grupos	0,902914	24	0,0376214		
	Total	0,0259095	29			
Cosecha	Entre grupos	1,7784	5	0,35568	1,94	0,1226
	Intra grupos	4,41148	24	0,183812		
	Total	6,1898	29			

P < 0,05 indica diferencias significativas.

**Anexo 5 Análisis de varianza área foliar para los estados de tres hojas y floración.**

Tres hojas	Fuente	Sumas de cuadrados	GL	Cuadrado medios	F-Cal	P-Valor
	Entre grupos	14,1466	5	2,82932	4,44	0,0053
	Intra grupos	15,2908	24	0,637115		
	Total	29,4373	29			
Floración	Entre grupos	315,713	5	63,1425	1,65	0,1846
	Intra grupos	397,301	24	16,5542		
	Total	1768,12	29			

P < 0,05 indica diferencias significativas.

**Anexo 6 Análisis de varianza longitud de plantas**

Fuente	Sumas de cuadrados	GL	Cuadrado medios	F-Cal	P-Valor
Entre grupos	452,788	5	90,5577	1,65	0,1846
Intra grupos	1315,33	24	54,8055		
Total	1768,12	29			

P < 0,05 indica diferencias significativas.

**Anexo 7 Efecto de los tratamientos sobre la altura final de las plantas.**

Repeticion	Testigo	JS c4	JS c5	JS c12	JS c26	JS c91
R 1	37,88	38,00	29,50	33,13	46,04	39,94
R 2	37,06	33,70	52,25	39,70	55,04	33,56
R 3	33,00	32,94	32,08	40,79	43,04	37,44
R 4	55,18	29,75	19,50	33,50	41,00	31,78
R 5	30,25	29,72	38,00	30,19	35,44	31,70
Media	39,87	32,82	34,27	35,46	44,11	34,88
Desviacion estandar	9,21	3,41	12,07	4,57	7,23	3,66

**Anexo 8 Análisis de varianza materia seca radical en estado de cosecha.**

Fuente	Sumas de cuadrados	GL	Cuadrado medios	F-Cal	P-Valor
Entre grupos	0,0296162	5	0,0059233	3,56	0,0150
Intra grupos	0,03992	24	0,00166333		
Total	0,0695367	29			

P < 0,05 indica diferencias significativas.

**Anexo 9 Análisis de varianza superficie radical en el estado de tres hojas.**

Fuente	Sumas de cuadrados	GL	Cuadrado medios	F-Cal	P-Valor
Entre grupos	66,2455	5	13,2491	3,58	0,0146
Intra grupos	88,7823	24	3,69926		
Total	155,028	29			

P < 0,05 indica diferencias significativas

**Anexo 10 Efecto de los tratamientos sobre la superficie radical en tres estados fenológicos.**

Tratamientos	X Tres hojas	X floración	X Cosecha	DS Tres hojas	DS floración	DS Cosecha
Testigo	5,682	6,540	15,208	2,04	3,38	10,46
JS c4	2,868	6,862	8,538	0,54	2,06	3,49
JS c5	6,552	9,350	11,988	1,54	6,29	8,28
JS c12	4,812	5,559	11,430	1,02	1,03	6,34
JS c26	7,412	12,859	19,488	3,52	4,85	8,62
JS c91	4,338	11,320	11,344	1,39	4,31	5,75

**Anexo 11 Análisis de varianza longitud radical en el estado de tres hojas.**

Fuente	Sumas de cuadrados	GL	Cuadrado medios	F-Cal	P-Valor
Entre grupos	3312,09	5	662,418	4,06	0,0082
Intra grupos	3912,93	24	163,059		
Total	7225,02	29			

P < 0,05 indica diferencias significativas.

**Anexo 12 Efecto de los tratamientos sobre la longitud radical en tres estados fenológicos.**

Tratamientos	X Tres hojas	X floración	X Cosecha	DS Tres hojas	DS floración	DS Cosecha
Testigo	45,448	38,148	63,146	15,51	18,98	37,67
JS c4	24,614	37,074	38,292	5,89	10,25	12,61
JS c5	54,164	45,976	49,356	14,85	24,86	23,54
JS c12	36,292	32,748	47,298	7,79	6,73	18,58
JS c26	52,224	60,400	87,147	17,09	23,52	38,39
JS c91	33,738	52,220	42,474	11,4	21,75	6,17

**Anexo 13 Análisis de varianza del rendimiento.**

Fuente	Sumas de cuadrados	GL	Cuadrado medios	F-Cal	P-Valor
Entre grupos	977,247	5	195,449	1,20	0,3398
Intra grupos	3914,9	24	163,121		
Total	4892,15	29			

P < 0,05 indica diferencias significativas.

**Anexo 14 Análisis de varianza del componente del rendimiento granos por metro cuadrado.**

Fuente	Sumas de cuadrados	GL	Cuadrado medios	F-Cal	P-Valor
Entre grupos	2933720	5	586744,0	1,51	0,2252
Intra grupos	9319100	24	369663,0		
Total	12252820	29			

P < 0,05 indica diferencias significativas

**Anexo 15 Efecto de los tratamientos en el componente del rendimiento granos por metro cuadrado.**

Repetición	Testigo	JS c4	JS c5	JS c12	JS c26	JS c91
R 1	1332	259	74	777	1110	1295
R 2	1480	518	1147	407	1628	925
R 3	0	1258	74	925	1924	74
R 4	2738	666	0	481	444	481
R 5	333	703	111	259	407	185
Media	1177	681	281	570	1103	592
Desviación estándar	1078	367	486	274	683	513

**Anexo 16 Efectos de los tratamientos sobre los parámetros: granos por planta y granos por espigas.**

Tratamientos	Grano planta <sup>-1</sup>	Grano espiga <sup>-1</sup>
Testigo	3,98	3,4
JS c4	2,30	2,3
JS c5	0,95	0,7
JS c12	1,93	2,4
JS c26	3,73	2,3
JS c91	2,00	1,8

**Anexo 17 Efecto de los tratamientos en el estado de floración y grano sobre el número de espigas por planta.**

Tratamientos	Floración	Grano
Testigo	0,90	1,00
JS c4	0,73	1,01
JS c5	0,93	1,03
JS c12	1,00	1,00
JS c26	0,78	1,53
JS c91	0,90	1,10

**Anexo 18 Efecto de los tratamientos en el estado de floración y grano sobre el número de macollos por planta.**

Repetición	Testigo	JS c4	JS c5	JS c12	JS c26	JS c91
R 1	0,75	0,38	0,13	0,38	0,63	0,13
R 2	0,00	0,75	0,38	0,50	1,00	0,25
R 3	0,25	0,13	0,00	0,13	0,75	0,38
R 4	1,13	1,25	0,00	0,13	0,38	0,25
R 5	0,38	0,38	0,38	0,75	0,50	0,25
Media	0,50	0,58	0,18	0,38	0,65	0,25
Desviación estándar	0,44	0,44	0,19	0,27	0,24	0,09