



## Caracterización de cepas nativas de *Azospirillum* spp. y su efecto en el desarrollo de *Oryza sativa* L. “arroz” en Lambayeque

## Characterization of native strains of *Azospirillum* spp. and its effect on growth of *Oryza sativa* L. “rice” in Lambayeque

Franklin García<sup>1</sup>, Harold Muñoz<sup>1</sup>, Carmen Carreño<sup>1,\*</sup>, Gilmar Mendoza<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología y Parasitología, Univ. Nac. Pedro Ruiz Gallo. Av. Juan XXIII 391. Lambayeque, Perú.

<sup>2</sup> Departamento de Agronomía y Zootecnia, Univ. Nac. de Trujillo. Av. Juan Pablo II s/n. Ciudad Universitaria. Trujillo, Perú.

Recibido 12 Abril 2010; aceptado 05 Junio 2010

### Resumen

La presente investigación se realizó para caracterizar y determinar el efecto de cepas nativas de *Azospirillum* spp. en el desarrollo de *Oryza sativa* L. “arroz”, como una alternativa para la disminución de fertilizantes químicos. Las bacterias se aislaron de raíces de arroz en Lambayeque. Fragmentos de raíces previamente desinfectadas se sembraron en medio Nfb semisólido, donde las bacterias fijadoras de nitrógeno se reconocieron por una película blanquecina bajo la superficie y el viraje del verde al azul. El género *Azospirillum* se identificó en medio agar rojo de Congo, obteniéndose 96 cepas con una producción de 2.69 a 38.02 ppm de ácido indolacético y 7.95 a 29.09 ppm de nitrógeno fijado. Las cuatro cepas con los mayores valores se inocularon independientemente así como en combinación con 50 y 100 % de úrea, en arroz INIA508-Tinajones. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorio, incluyendo testigos 50 y 100 % de úrea y testigo absoluto, Todas las cepas nativas incrementaron la altura y materia seca de la parte aérea y raíces, con índices de efectividad de hasta 21.77, 102.06 y 126.11% en relación al testigo absoluto. *Azospirillum* sp. GM-86 seleccionado por el mayor valor de ácido indolacético, alcanzó el mayor índice de efectividad en altura y biomasa seca de raíz. La aplicación de 50 % de úrea con *Azospirillum* spp. incrementó los índices de efectividad. Se demostró el potencial de cepas nativas de *Azospirillum* spp. para incrementar el desarrollo de arroz, así como la posibilidad de utilizarlas asociadas con dosis mínimas de úrea.

**Palabras clave:** *Azospirillum*, PGPR, *Oryza sativa* L., indolacético, nitrógeno.

### Abstract

This research was conducted to characterize and determine the effect of native strains of *Azospirillum* spp. on growth of *Oryza sativa* L. "rice" as an alternative for the reduction of chemical fertilizers. The bacteria were isolated from roots of rice in Lambayeque. Fragments of previously disinfected roots were planted in Nfb semisolid medium, were nitrogen-fixing bacteria were recognized by a whitish film on the surface and turn from green to blue. The genus *Azospirillum* was identified in Congo red agar medium, obtained 96 isolates with production of 2.69 to 38.02 ppm indoleacetic acid and 7.95 to 29.09 ppm of fixed nitrogen. The four strains with the highest values were inoculated independently and in combination with 50 and 100 % urea in Tinajones INIA508 rice. It used a completely randomized design and including witnesses' 50 and 100 % urea and absolute control. All native strains increased height and dry matter of shoot and roots, with effectiveness index of up to 21.77, 102.06 and 126.11 % compared to untreated control. *Azospirillum* sp. GM-86 selected by the highest value of indoleacetic acid, reached the highest level of effectiveness in height and root dry biomass. The application of 50 % urea with *Azospirillum* spp. increased rates of effectiveness. It demonstrated the potential of native strains of *Azospirillum* spp. to increase the growth of rice as well as the possibility to use associate with low doses of urea.

**Keywords:** *Azospirillum*, PGPR, *Oryza sativa* L., indoleacetic acid, nitrogen.

\* Autor para correspondencia

E-mail: crcf1@hotmail.com (C. Carreño)

## 1. Introducción

El arroz (*Oryza sativa* L.) es el alimento básico para más de la mitad de la población mundial, y representa el segundo cereal con más hectáreas sembradas a nivel mundial después del trigo. El Perú ocupa la posición 14 en producción a nivel mundial con 1664700 t de arroz al año, superado por Colombia con 2100000 t y Brasil con 10940500 t, siendo China el mayor productor del mundo con 592.9 millones de t anuales (Infoagro, 2008).

La forma más conocida y empleada para suplir las necesidades de nitrógeno del arroz es la fertilización química; sin embargo, bajo un manejo inadecuado constituye un riesgo ecológico por contaminación del suelo y del agua. Existe discrepancia entre la cantidad de fertilizante nitrogenado aplicado y lo que realmente es utilizado por la planta o coeficiente de utilización. Se ha determinado que el nitrógeno aplicado a un cultivo está expuesto a pérdidas de hasta 67 % (Hernández, 2003), quedando un exceso de compuestos nitrogenados en el ecosistema lo que representa la mayor fuente de contaminación, de óxidos de nitrógeno en la atmósfera y nitratos en las aguas superficiales y profundas. La utilización de biofertilizantes constituidos por bacterias que fijan nitrógeno, solubilizan nutrientes, producen hormonas y estimulan la protección frente al ataque de plagas y patógenos, representa una alternativa para disminuir el uso de fertilizantes químicos. Estas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) incluyen al género *Azospirillum*, con especies de vida libre, presentes en suelos a nivel mundial y capaces de fijar nitrógeno molecular del ambiente, producir fitohormonas e incrementar la productividad agrícola (Okon y Labandera, 1994; Vicentini, 2007). A pesar que existen biofertilizantes comerciales de *Azospirillum* spp., su aplicación no siempre es efectiva, por lo cual se prefiere el uso de microorganismos nativos, adaptados a las

condiciones climáticas y que puedan competir exitosamente con la biota nativa.

Por otro lado, una de las principales actividades económicas en la región Lambayeque es la agricultura, contando con 70000 hectáreas de cultivos como el arroz (MINAG, 2008). En una agricultura sostenible y respetuosa con el ambiente, la aplicación de bacterias nativas del género *Azospirillum*, constituye una alternativa para incrementar los rendimientos en el cultivo de arroz, sin necesidad de aplicar fertilizantes químicos; sin embargo, en la actualidad no existen estudios de la existencia de *Azospirillum* spp. en cultivos de *Oryza sativa* L “arroz” en la región Lambayeque, por lo que se realizó el presente estudio, cuyos objetivos fueron aislar e identificar cepas nativas de *Azospirillum* spp. en raíces de arroz; cuantificar el nitrógeno fijado y el ácido indolacético producido, así como determinar en condiciones de invernadero el efecto de la inoculación de cuatro cepas nativas de *Azospirillum* spp. en el desarrollo del cultivo de arroz.

## 2. Materiales y métodos

**Diseño metodológico:** El trabajo de investigación se ejecutó en dos fases: en la primera fase se realizó el aislamiento, identificación a nivel de género, cuantificación de nitrógeno fijado y ácido indolacético producido por cepas nativas de *Azospirillum* spp. utilizando un diseño no experimental transeccional descriptivo (Hernández *et al.*, 2003). En la segunda fase (investigación explicativa) se determinó el efecto de la inoculación de cuatro cepas nativas de *Azospirillum* spp. fijadoras de nitrógeno y productoras de ácido indolacético en el desarrollo de *Oryza sativa* L “arroz” var. INIA508-Tinajones en condiciones de invernadero.

**Muestreo:** Durante los meses de abril a junio de 2009 se recolectaron 104 muestras de

raíces de cultivos de arroz en la etapa de “grano pastoso”, establecidos en campos comerciales del distrito Pomalca (6° 45' y 6° 46' de latitud sur y 79° 46' y 79° 48' de longitud oeste) provincia de Chiclayo, región Lambayeque. La zona presenta un clima subtropical árido, con un rango de temperatura media de 32.5 °C. Las muestras se depositaron en bolsas plásticas debidamente etiquetadas e inmediatamente se transportaron para su procesamiento en el laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

#### **Obtención de cepas nativas de *Azospirillum* spp.**

Las raíces se lavaron con agua potable hasta eliminar el suelo remanente. Se cortaron en secciones de aproximadamente 5 cm, luego se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 2 %, durante 5 minutos y se enjuagaron dos veces consecutivas con agua destilada estéril. Luego se cortaron en secciones de un tamaño aproximado de 2 cm de longitud y se enjuagaron con agua destilada estéril. Para favorecer el crecimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno, se realizó el enriquecimiento de cada una de las muestras, depositando las raíces de 10 a 15 mm por debajo de la superficie en tubos conteniendo 6 mL de medio libre de nitrógeno con azul de bromotimol (Nfb) semisólido (un fragmento por tubo). La incubación se realizó en aerobiosis a 30 °C por 5 días y se seleccionaron los tubos donde se observó viraje del color verde del medio hacia el azul y la presencia de una película gruesa blanquecina entre 3 a 5 mm bajo la superficie. Posteriormente, se tomó una alícuota de la película, con la que se obtuvo una suspensión en 1 mL de solución salina fisiológica estéril, y se sembró por agotamiento y estría en placas de Petri con medio Nfb sólido con 20 mgL<sup>-1</sup> de extracto de levadura. Después de una incubación a 30 °C durante 3 a 5 días, se desarrollaron colonias blanquecinas y pequeñas con viraje

del verde al azul. A continuación, se realizó tinción de Gram y cuando se observaron bacilos Gram negativos, se seleccionó la colonia y se sembró en medio Nfb semisólido en aerobiosis a 30 °C por 1 semana y posteriormente en placas de Petri conteniendo medio agar rojo de Congo a 30 °C por 48 a 72 h. Después se seleccionaron las colonias rojo escarlata, se realizó tinción de Gram para confirmar la morfología y reacción tintorial y se sembró en placas de Petri con agar nutritivo para obtener cultivos puros. La identificación de *Azospirillum* spp. se realizó en función de las características morfológicas y fisiológicas (Holt *et al.*, 1994; Pérez y Casas, 2005).

#### **Cuantificación de nitrógeno y ácido indolacético**

Con cada una de las cepas nativas de *Azospirillum* spp. cultivadas en agar nutritivo a 30 °C por 48 h, se obtuvo una suspensión celular en solución salina fisiológica estéril cuya concentración se estandarizó a 1x10<sup>8</sup> células mL<sup>-1</sup>. Para cuantificar el nitrógeno fijado se inoculó 1 mL de cada suspensión bacteriana en 5 mL de caldo extracto de suelo 10%, incubando a 30 °C durante 72 h a 150 rpm. Se agregaron 15 mL de KCl 2M, los tubos se agitaron (150 rpm) durante 1 hora y luego se dejaron en reposo durante 1 h adicional. Posteriormente se tomaron 10 mL del sobrenadante y se centrifugaron (2000 rpm) durante 20 minutos. Se tomó el sobrenadante y se añadieron 0.4 mL de solución alcohólica de fenol 10%; 0.4 mL de nitroprusiato de sodio 0.5 % y 1 mL de solución oxidante. Se agitó para mezclar y luego de 1 h de reposo se observó una coloración azul, realizando la lectura en espectrofotómetro a 632.9 nm. Las concentraciones se calcularon en una recta patrón obtenida con diluciones sucesivas de una solución de 100 ppm de cloruro de amonio. Por otro lado, para cuantificar el ácido indolacético producido, se inoculó 1 mL de cada suspensión bacteriana en 5 mL de caldo tripticasa soya suplementado con

triptófano incubando a 30 °C durante 72 horas a 150 rpm, y posteriormente se centrifugó a 1000 rpm durante 15 minutos. A continuación se tomaron 0.4 mL del sobrenadante y se agregaron 1.6 mL de reactivo Salkowski modificado en una proporción 4:1. Se mezcló y dejó en reposo en oscuridad durante 30 minutos. Posteriormente se observó una coloración violácea y se realizó la lectura en espectrofotómetro a 530 nm. Las concentraciones se calcularon en una recta patrón obtenida con diluciones sucesivas de una solución de 1 ppm de ácido indolacético. Para la fase experimental se seleccionaron las cuatro cepas nativas de *Azospirillum* spp. que alcanzaron los valores mayores en nitrógeno fijado y ácido indolacético producido.

### **Recolección y análisis fisicoquímico del suelo experimental**

En ocho campos agrícolas comerciales del distrito de Pomalca, se recolectaron 48 submuestras de suelo de 2 kg cada una, a una profundidad de 0.30 cm. Las submuestras se mezclaron entre sí para obtener un total de 96 kg de suelo y se tomó 1 kg para realizar la caracterización fisicoquímica en el laboratorio de Suelos de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Según los resultados, el suelo es fuertemente alcalino con un pH de 8.05 y fuertemente salino con una CE de 12.75 mmhos cm<sup>-1</sup>, con una textura franco areno - arcilloso, con un contenido bajo de materia orgánica, nitrógeno y fósforo, de 1.98 %, 0.09 % y 5.8 ppm respectivamente y un contenido muy alto de potasio de 617.9 ppm. Después de la caracterización, el suelo se tamizó con una malla de 0.16 mm, se esterilizó en autoclave a 121 °C, a 1 atmósfera de presión durante 3 horas (Díaz, 2001) y se distribuyó en 45 macetas a razón de 2 kg por maceta.

### **Registro de temperatura**

Durante los meses de noviembre a diciembre de 2009 y enero de 2010 la temperatura

promedio en invernadero fue de 29°C con un valor máximo de 32°C y un mínimo de 28°C.

### **Características de la especie vegetal cultivada**

Se sembró arroz variedad INIA508-Tinajones, obtenido por la Estación Experimental Agraria Vista Florida del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA, 2007). La variedad es semi-precoz, requiere 142 días para la maduración total del grano, con 143 a 171 granos llenos por panoja, una moderada resistencia a *Helminthosporium oryzae*, y moderada susceptibilidad a *Pyricularia grisea*. En campos comerciales se han registrado rendimientos superiores a 13.7 t ha<sup>-1</sup>.

### **Diseño experimental**

Se utilizó el Diseño Experimental Completamente Aleatorio (DCA), con quince tratamientos y tres repeticiones, totalizando 45 unidades experimentales. Los tratamientos correspondieron a cuatro cepas nativas de *Azospirillum* spp. (GM47, GM57, GM84, y GM86), dos testigos químicos (fertilizante nitrogenado 50 y 100% de úrea), nueve tratamientos donde se combinaron cada cepa de *Azospirillum* sp. con fertilizante nitrogenado 50 y 100% y un testigo absoluto (sin inoculó y sin fertilizante químico).

### **Siembra de semillas de arroz**

En cada una de las macetas el suelo fue saturado con agua. Las semillas, se remojaron por 48 horas para lograr la pre-germinación y luego se sembraron a razón de diez por maceta. Después de 35 días se eliminaron las plantas más pequeñas, para finalmente conservar cuatro por maceta.

### **Fertilización nitrogenada**

La dosis 100 % de úrea utilizada para la fertilización química fue de 120 kg Nha<sup>-1</sup>, que en el experimento fue equivalente a 0.817 g de úrea por maceta y se aplicó en forma de disolución acuosa. La fertilización se

fraccionó en dos partes, la mitad a la siembra y la otra mitad 35 días después.

**Inoculación de *Azospirillum* spp.**

Cada cepa nativa seleccionada fue cultivada en agar nutritivo a 30 °C por 48 h. La biomasa desarrollada se cosechó con solución salina fisiológica estéril, obteniendo una suspensión. La primera inoculación se realizó a la siembra, depositando 20 mL de suspensión con 600 millones de bacterias por mL. La segunda inoculación se realizó 35 días después de la siembra, aplicando 10 mL con 300 millones de bacterias por mL.

**Evaluaciones**

Transcurridos 70 días después de la siembra, se extrajeron las plantas, determinándose la altura y el peso de la materia seca aérea y radicular. Asimismo, se calculó el índice de efectividad de la inoculación (IEI) expresado en porcentaje:

$$I.E.I(\%) = \frac{\text{Tratamiento con inoculación} - \text{Control sin inoculación}}{\text{Control sin inoculación}} \times 100$$

**Análisis estadístico**

Se realizó el análisis de varianza para determinar las diferencias entre los tratamientos y la prueba múltiple de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) para comparar la medias entre ellos (Hernández *et al.*, 2003). Se utilizó el software estadístico SPSS versión 15.0.

**3. Resultados y discusión**

El 65.38% de las muestras de raíces resultó positivo en el enriquecimiento para bacterias fijadoras de nitrógeno y 55.77% resultó positivo para el aislamiento de *Azospirillum* spp., coincidiendo con Hernández (2003) y Vicentini *et al.* (2007), quienes identificaron *Azospirillum lipoferum*, *A. amazonense* y *A. brasilense* en arroz.

Las cepas nativas de *Azospirillum* spp. fijaron nitrógeno y sintetizaron ácido indolacético *in vitro* coincidiendo con investigadores como Zakharova (1999); Asghar (2002); Halda

(2003) y Vicentini (2007). Los valores de nitrógeno oscilaron entre 29.09 y 7.95 ppm para GM-57 y GM-24 respectivamente y los valores de ácido indolacético, oscilaron entre 38.02 y 2.69 ppm para GM-86 y GM-67 respectivamente (Tabla 1). Se seleccionaron GM-57 y GM-47 por los mayores valores en nitrógeno y GM-86 y GM-84 por los mayores valores en ácido indolacético.

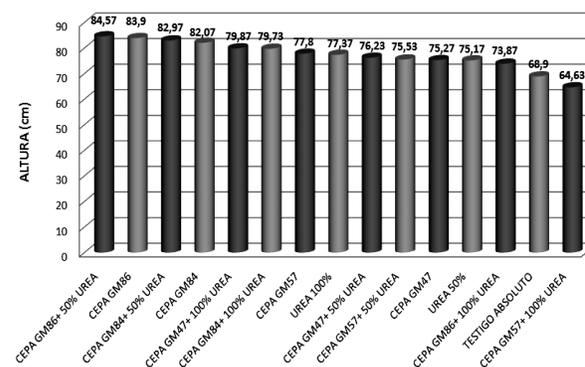
**Tabla 1**

Nitrógeno fijado (ppm de amonio) y ácido indolacético (ppm) producido por cuatro cepas nativas de *Azospirillum* spp.

Cepa <i>Azospirillum</i> spp.	Amonio (ppm)	Ácido indolacético (ppm)
GM-57	29.09	18.02
GM-47	29.05	12.91
GM-86	28.20	38.02
GM-84	25.06	35.35

**Altura de planta**

Los valores promedios de altura de planta a los 70 días oscilaron entre 84.57 y 64.63 cm para *Azospirillum* sp. GM86 + 50 % de úrea y GM57 + 100% de úrea, respectivamente (Figura 1). La prueba “F” del análisis de varianza resultó altamente significativa y según la prueba discriminadora de Tukey (Tabla 2) la mayor altura se alcanzó con GM86 + 50% de úrea, diferenciándose significativamente del testigo absoluto.



**Figura 1.** Altura de plantas de *Oryza sativa* L por efecto de cuatro cepas nativas de *Azospirillum* spp. y sus combinaciones con 50 y 100 % de úrea.

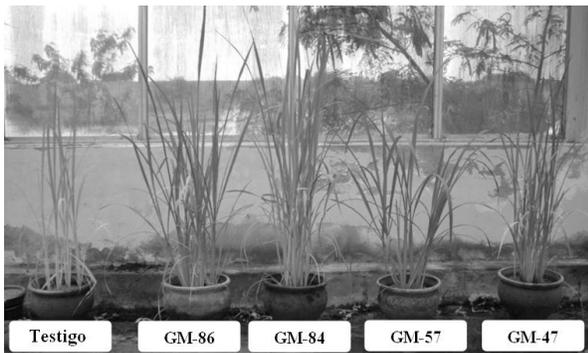
**Tabla 2**

Prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) de altura (cm) de *Oryza sativa* L por efecto de cuatro cepas nativas de *Azospirillum* spp. y sus combinaciones con 50 y 100% de úrea.

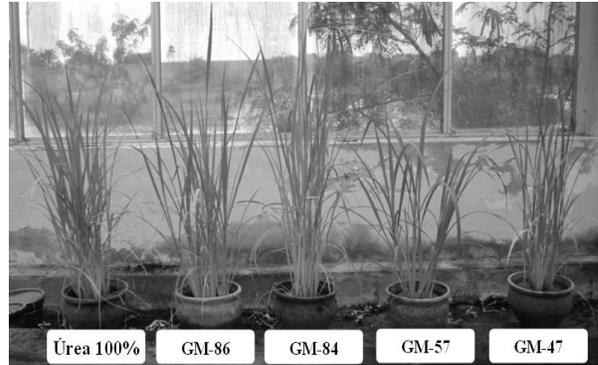
Tratamientos	Altura planta (cm)	Significancia*
Cepa GM86+50% úrea	84.57	a
Cepa GM86	83.90	a b
Cepa GM84+50% úrea	82.97	a b c
Cepa GM84	82.07	a b c d
Cepa GM47+ 100% úrea	79.87	a b c d e
Cepa GM84+ 100% úrea	79.73	a b c d e
Cepa GM57	77.80	b c d e
100% úrea	77.37	c d e
Cepa GM47+ 50% úrea	76.23	d e
Cepa GM57+ 50% úrea	75.53	e
Cepa GM47	75.27	e
50% úrea	75.17	e f
Cepa GM86+ 100% úrea	73.87	e f
Testigo absoluto	68.90	f g
Cepa GM57+ 100% úrea	64.63	g

\*Tratamientos seguidos por la misma letra no difieren significativamente.

Todas las cepas nativas de *Azospirillum* spp. incrementaron significativamente la altura de plantas de arroz respecto al testigo absoluto (Figura 2), con índices de efectividad de hasta 21.77%. La cepa GM-86 alcanzó el mayor valor en altura, no diferenciándose significativamente de GM-84, pero sí de GM-57 y GM-47. Las cepas GM-86, GM-84 y GM-57 incrementaron la altura, diferenciándose significativamente del testigo químico 50 y 100 % de úrea (Figura 3).



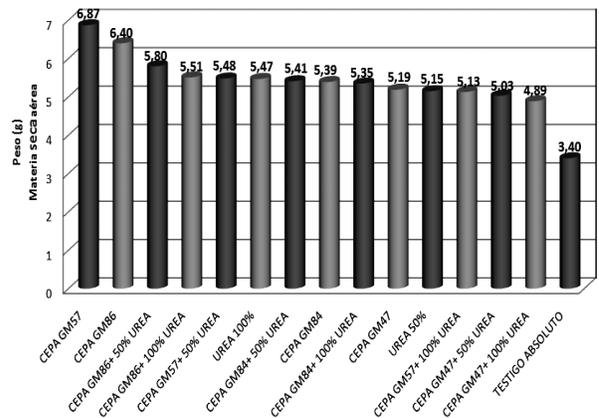
**Figura 2.** Altura de *Oryza sativa* L. por efecto de cuatro cepas nativas de *Azospirillum* spp., en comparación con el testigo absoluto.



**Figura 3.** Altura de *Oryza sativa* L. por efecto de cuatro cepas nativas de *Azospirillum* spp., en comparación con el testigo químico.

**Peso de materia seca de parte aérea**

Los valores promedios del peso de materia seca de la parte aérea oscilaron entre 6.87 y 3.40 g para GM-57 y testigo absoluto respectivamente (Figura 4). La prueba “F” del análisis de varianza resultó significativa y según la prueba de Tukey (Tabla 3) los mayores pesos se alcanzaron con GM-57 y GM-86, no diferenciándose estadísticamente entre ellos, pero sí de los demás tratamientos. Todas las cepas nativas de *Azospirillum* spp. incrementaron significativamente el peso de materia seca de la parte aérea, respecto al testigo absoluto, con índices de efectividad de 102.06% (GM-57); 88.24% (GM-86); 58.53% (GM-84) y 52.65% (GM-47).



**Figura 4.** Peso de materia seca aérea de *Oryza sativa* L. por efecto de cuatro cepas nativas de *Azospirillum* spp. y sus combinaciones con 50 y 100% de úrea.

**Tabla 3**

Prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) del peso de materia seca de la parte aérea de *Oryza sativa* L. por efecto de cuatro cepas nativas de *Azospirillum* spp. y sus combinaciones con 50 y 100% de úrea.

Tratamientos	Peso parte aérea (g)	Significancia*
Cepa GM57	6.87	a
Cepa GM86	6.40	a
Cepa GM86+ 50% úrea	5.80	b
Cepa GM86+ 100% úrea	5.51	b c
Cepa GM57+ 50% úrea	5.48	b c
100% úrea	5.47	b c
Cepa GM84+ 50% úrea	5.41	b c d
Cepa GM84	5.39	b c d
Cepa GM84+ 100% úrea	5.35	b c d
Cepa GM47	5.19	c d
50% úrea	5.16	c d
Cepa GM57+ 100% úrea	5.13	c d
Cepa GM47+ 50% úrea	5.03	c d
Cepa GM47+ 100% úrea	4.89	d
Testigo absoluto	3.40	e

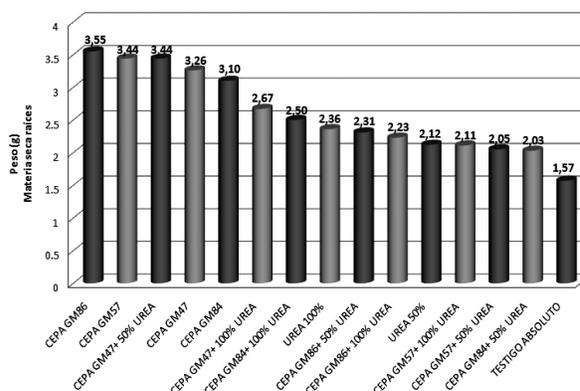
\*Tratamientos seguidos por la misma letra no difieren significativamente.

Las cepas nativas GM-57 y GM-86 incrementaron el peso de la materia seca de la parte aérea, diferenciándose significativamente de los testigos químicos 50 y 100% de úrea. Con GM-84 y GM-47 las plantas alcanzaron un mayor peso que con 50 % de úrea. Asimismo con GM-84 el peso de la parte aérea fue estadísticamente igual al de 100 % úrea, mientras que con GM-47 el peso fue estadísticamente menor que 100 % de úrea.

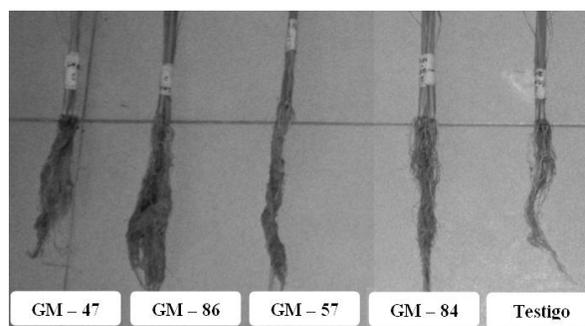
### Peso de materia seca de raíces

Los valores promedios del peso de materia seca de raíces oscilaron entre 3.55 y 1.57 g para *Azospirillum* sp. GM-86 y el testigo absoluto respectivamente (Figuras 5 y 6). La prueba “F” del análisis de varianza resultó altamente significativa y según la prueba de Tukey (Tabla 4) los mayores pesos se alcanzaron con GM-86, GM-57, GM-47 y GM84, así como GM-47 más 50 % de úrea, no diferenciándose estadísticamente entre ellos, pero sí de los demás tratamientos.

Todas las cepas nativas de *Azospirillum* spp. incrementaron significativamente el peso de materia seca de raíces de arroz, respecto al testigo absoluto, con índices de efectividad de 126.11 % (GM-86); 119.11 % (GM-57); 107.66 % (GM-47) y 97.45 % (GM-84). Asimismo se diferenciaron significativamente de los testigos químicos 100 y 50% de úrea.



**Figura 5.** Peso de materia seca de raíces de *Oryza sativa* L. por efecto de cuatro cepas nativas de *Azospirillum* spp. y sus combinaciones con 50 y 100 % de úrea.



**Figura 6.** Raíces de *Oryza sativa* L. por efecto de cuatro cepas nativas de *Azospirillum* spp.

Las cepas nativas de *Azospirillum* spp. seleccionadas por alcanzar los mayores valores en la fijación de nitrógeno y producción de ácido indolacético, influenciaron positivamente en el desarrollo vegetativo de arroz variedad INIA508-Tinajones, incrementando la altura, así como el peso de la materia seca de la parte aérea y raíces de las plantas; coincidiendo con diversos investigadores (Bashan, 1998;

Holgin, 2003; Cholula, 2005; Schoebitz, 2006; Vicentini, 2007), quienes demostraron que bacterias del género *Azospirillum* favorecen el desarrollo vegetativo y rendimiento de los cultivos, por lo que son consideradas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). Bashan y Holguin (1997) concluyeron que *Azospirillum* es de particular interés, debido a su versatilidad metabólica, capacidad para fijar nitrógeno, producción de fitohormonas, formación de células tipo quiste que le permiten resistir diferentes tipos de estrés ambiental, y capacidad para adherirse a cualquier sistema de raíces. Asimismo, Bashan *et al.* (2000) observaron que algunos efectos benéficos de *Azospirillum* en las plantas son el incremento de altura, área radicular y rendimiento del cultivo.

**Tabla 4**

Prueba de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) del peso de materia seca de raíces de *Oryza sativa* L. por efecto de cuatro cepas nativas de *Azospirillum* spp. y sus combinaciones con 50 y 100 % de úrea.

Tratamientos	Peso de raíces (g)	Significancia*
Cepa GM86	3.550	a
Cepa GM47+ 50% úrea	3.437	a
Cepa GM57	3.435	a
Cepa GM47	3.258	a
Cepa GM84	3.102	a b
Cepa GM47+ 100% úrea	2.667	b c
Cepa GM84+ 100% úrea	2.503	c d
100% úrea	2.355	c d
Cepa GM86+ 50% úrea	2.308	c d
Cepa GM86+ 100% úrea	2.233	c d
50% úrea	2.120	c d e
Cepa GM57+ 50% úrea	2.053	d e
Cepa GM84+ 50% úrea	2.025	d e
Cepa GM57+ 100% úrea	2.012	d e
Testigo absoluto	1.570	e

\*Tratamientos seguidos por la misma letra no difieren significativamente.

*Azospirillum* sp. GM-86 seleccionada porque alcanzó el mayor valor de ácido indolacético (38.02 ppm), también alcanzó los mayores índices de efectividad en altura (21.77 %), y biomasa seca de la raíz (126.11%). Los

resultados coinciden con Schoebitz (2006), quien inoculó *Azospirillum brasilense* en *Lolium perenne*, observando 20 % de incremento en longitud de las plantas, y 80% de incremento en el peso de la biomasa radical frente al testigo, por lo que concluyó que la promoción del crecimiento de las raíces es uno de los principales parámetros, por el que se evalúa el efecto benéfico de las bacterias promotoras del crecimiento como *Azospirillum* sp.

La producción de ácido indolacético, y la alta sensibilidad de las raíces a dicha hormona son fundamentales, en la respuesta a la inoculación de *Azospirillum* (Cholula, 2005), donde se observa frecuentemente un mayor desarrollo radical, que se traduce en mayor superficie de absorción de nutrientes, y así, un mayor desarrollo de la parte aérea de la planta. Patten y Glick (2002) concluyeron que el ácido indolacético producido por *Azospirillum* contribuiría al “pool” endógeno de hormonas de la planta, imitando el efecto de una aplicación exógena. De esta forma el ácido indolacético bacteriano estimularía el desarrollo del sistema radical y el crecimiento general de la planta hospedera. Por su parte, Tien *et al.* (1979) sugirieron que las fitohormonas podrían ser las responsables del mayor crecimiento de la raíz, hipótesis que fue comprobada por Bashan *et al.* (2004) obteniendo mutantes Tn 5 indol - piruvato descarboxilasa que no producían auxinas y que mostraron una reducida capacidad para promover la proliferación de pelos radiculares y ramificaciones de la raíz.

*Azospirillum* sp. GM-57 alcanzó el mayor valor de nitrógeno fijado (29.09 ppm) y también el mayor índice de efectividad en biomasa seca de la parte aérea (102.06 %); sin embargo, *Azospirillum* sp. GM-47 que alcanzó un valor de nitrógeno fijado (29.05 ppm) muy similar al de *Azospirillum* sp. GM-57, presentó el menor índice de efectividad en biomasa seca de la parte aérea (52.65 %). Los resultados aparentemente contradictorios

sugieren que el incremento de la biomasa aérea no solo es consecuencia de la transferencia de nitrógeno a la planta, a través del mecanismo de fijación biológica no simbiótica de *Azospirillum* spp. A pesar que la capacidad de fijación de nitrógeno fue el primer mecanismo propuesto para explicar el mayor desarrollo de las plantas inoculadas con *Azospirillum*; estudios posteriores demostraron que la contribución de fijación de nitrógeno por la bacteria a la planta estaba en un rango de 5 a 18 % y en arroz entre 0 a 30 % (Cholula, 2005). Debido a que en la mayoría de los estudios no se observan diferencias significativas en la concentración de nitrógeno o en el contenido de proteína entre plantas inoculadas y no inoculadas, se ha sugerido que la fijación biológica de nitrógeno por *Azospirillum* no es responsable de los beneficios observados en plantas inoculadas. Anwar (2000) determinó que el incremento de la biomasa vegetal es consecuencia de la producción de fitohormonas (ácido indolacético y giberelinas) por parte de las PGPR. Dichas hormonas fueron extraídas y analizadas individualmente, y se encontró que el ácido indolacético en rangos de 1 - 2 ppm incrementaban las raíces, pero principalmente la biomasa en plantas de arroz. Las hormonas de crecimiento contenidas en extractos de *Pseudomonas* sp. incrementaron la longitud radicular, mientras que la aplicación de hormonas de crecimiento contenidos en extractos de *Azospirillum* sp. incrementaron la biomasa vegetal.

La aplicación de úrea con las cepas nativas de *Azospirillum* spp. influyó distintivamente el desarrollo de arroz INIA508-Tinajones, en relación al de las plantas donde no se aplicó úrea y sólo se inoculó *Azospirillum* spp. Se observó incremento de la altura (GM-86, GM-84 y GM-47), así como del peso de la materia seca de parte aérea (GM-84) y raíces (GM-47). Los resultados coinciden con Okon y Labandera (1994) y Alfonso *et al.* (2005), quienes sostienen que la inoculación de

*Azospirillum* spp. es favorecida con la aplicación de dosis intermedias de fertilizante químico. Asimismo, Okon y Labandera (1994) determinaron que en experimentos desarrollados durante 20 años (1974-1994), el éxito de la inoculación de *Azospirillum* fue en el rango de 60 a 70 %; sin embargo, cuando se evaluó el efecto de la inoculación en conjunto con la aplicación de niveles intermedios de fertilización con nitrógeno, fósforo, y potasio, el éxito de los experimentos se incrementó hasta 90%. Coincidiendo al respecto, Schloter y Hatmann (1998) concluyeron que las variables básicas que contribuyen a la respuesta de la inoculación son los cultivares, que muestran comportamientos diferentes, y el nivel de fertilización nitrogenada; por lo que la inoculación de *Azospirillum* spp. puede considerarse un sustituto parcial de la fertilización nitrogenada.

#### 4. Conclusiones

Los resultados obtenidos indican que es posible obtener aislamientos de *Azospirillum* spp. de raíces de arroz, eficientes fijadores de nitrógeno y productores de ácido indolacético. Las cepas nativas GM-86 y GM-84 seleccionadas por alcanzar los mayores valores de ácido indolacético (38.02 y 35.35 ppm) y GM-57 y GM-47 en fijación de nitrógeno (29.09 y 29.05 ppm de amonio) incrementaron el desarrollo vegetativo de la variedad INIA508-Tinajones de arroz, en condiciones de invernadero, con índices de efectividad de hasta 21.77 % en altura, así como 102.06 % y 126.11 % en materia seca de parte aérea y raíces. Asimismo se demostró la posibilidad de utilizarlas junto con dosis mínimas de úrea.

#### Referencias

- Alfonso, E.; Leyva, A.; Hernández, A. 2005. Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Revista Colombiana Biotecnología 7: 47-54.

- Anwar, G. 2000. Production of growth hormones and nitrogenase by diazotrophic bacteria and their effect on plant growth. PhD thesis. University of Punjab. Lahore. Pakistán.
- Asghar, H. 2002. Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biology and Fertility of Soils* 35: 231-237.
- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol Adv* 16: 729-770.
- Bashan, Y.; Holguin, G. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can J Microbiol* 43:103-121.
- Bashan, Y.; Holguin, G.; De Bashan, L.E. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can J Microbiol* 50: 521-577.
- Bashan, Y.; Moreno, M.; Troyo, E. 2000. Growth promotion of the seawater-irrigated oilseed halophyte *Salicornia bigelobii* inoculated with mangrove rhizosphere bacteria and halotolerant *Azospirillum* spp. *Biol. Fert. Soils* 32: 265-272.
- Cholula, L.P. 2005. Estudio de la producción de poli  $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) en *Azospirillum brasilense* Sp7. Centro de Biotecnología Genómica IPN Tamaulipas, México.
- Díaz, P. 2001. Inoculación de bacterias promotoras del crecimiento en lechuga. *Revista Terra* No. 4. Octubre - Diciembre 2001. Disponible en: <http://www.chapingo.mx/terra/contenido/19/4/tc.html>
- Halda, L. 2003. Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effusus* L. *Cambridge Journal of Microbiology* 49: 781-787.
- Hernández, W. 2003. Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum*, y evaluación de su capacidad para suplir las necesidades de nitrógeno en plantas de arroz (*Oryza sativa*). Bachiller en Ingeniería en Biotecnología. [En línea]. Centro de Investigaciones Agronómicas Universidad de Costa Rica. Disponible en: <http://bibliodigital.itcr.ac.cr:8080/dspace/bitstream/2238/44/1/BJFIB200342.pdf>
- Hernández, R.; Fernández, C.; Baptista, P. 2003. *Metodología de la Investigación*. 3 ed. Mc Graw Hill Interamericana Editores S.A., México.
- Holguin, G. 2003. Promoción del crecimiento en plantas por bacterias de las rizósfera. *Agricultura Técnica en México* 29: 2-5.
- Holt, J.G.; Graig, N.; Sneath, P.; Stoley, J.; William, S. (edit). 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9 ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Infoagro. 2008. El cultivo de arroz. Madrid, España. Disponible en: <http://www.infoagro.com/herbaceos/cereales/arroz.htm>
- Instituto Nacional de Investigación Agraria, INIA. 2007. Liberación de nueva variedad de arroz Tinajones. Nota de prensa 051-2007-INIA-PW. Disponible en: <http://www.inia.gob.pe/notas/nota0178/>
- Ministerio de Agricultura. 2008. Encuentro económico y social Región Lambayeque. Octubre 2008, Boletín informativo. Disponible en: <http://www.scribd.com/doc/13744443/COMPLETO>
- Okon, Y.; Labandera, C. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 26: 1591-1601.
- Patten, CH.; Glick, B. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indolacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3795-3801.
- Pérez, J.; Casas, M. 2005. Estudio de la interacción Planta-*Azospirillum* en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum* sp.). Instituto Nacional de Investigaciones de la caña de azúcar (INICA). Boyeros, Cuba.
- Schlöter, M.; Hatmann, A. 1998. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain-specific monoclonal antibodies. *Symbiosis* 25: 159-179.
- Schoebitz, M. 2006. Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de *Lolium perenne* L. de suelo volcánico (modelo género *Azospirillum* spp.). Tesis Lic. Ciencias Agrarias. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2006/fas364a/doc/fas364a.pdf>
- Tien, T.; Gaskins, M.; Hubbell, D. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 1016-1024.
- Vicentini, A. 2007. Fijación de nitrógeno y producción de ácido indolacético *in vitro* por bacterias diazotróficas endofíticas. *Pesq. Agropec. Brasília.* 42: 1459-1465.
- Zakharova, E. 1999. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*: insights from quantum chemistry. *European Journal of Biochemistry* 259: 572-576.