

Artículo científico**SELECCIÓN DE CEPAS BACTERIANAS CON POTENCIAL ESTIMULADOR DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN *PHASEOLUS VULGARIS* L. (CV. 'LEWA')**

Yarelis Ortiz Núñez, Yoania Ríos Rocafull, Yuliet Aguado Rodríguez, Luis C. Rodríguez Roque, Yannin Lorenzo Rodríguez, Lazara Deliz Moreno, María E. Álvarez Valdés, Janet Rodríguez Sánchez, Idalmis Zulueta Pellicer y José Antonio Fresneda Buides.

RESUMEN

Los estudios con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB, por sus siglas en inglés), se han sistematizado y profundizado en el tiempo, con lo que se han llegado a elaborar metodologías para su aplicación, que incluyen el aislamiento de bacterias, la clasificación de cepas, los estudios de interacción de microorganismos con la planta y la selección de cepas promisorias, entre otros. En este trabajo se evaluó, en condiciones *in vitro*, el efecto estimulador del crecimiento de 10 cepas de bacterias conservadas en la colección INIFAT, sobre semillas de frijol común (cv. 'Lewa'). Las cepas pertenecientes a los géneros *Bacillus* sp. (B3, B4, B8), *Azotobacter* sp. (A11, A20, F14) y *Rhizobium* sp. (Ciat, F1, F7, R5) no muestran una influencia significativa en el número de semillas germinadas a excepción de las cepas A11 y F7. Sin embargo, influyen positivamente en el número de hojas verdaderas y se destaca la cepa F7 con valores similares al ácido indol acético (AIA). Además, las cepas de los géneros *Bacillus* (B4) y *Rhizobium* (F1, F7) incrementan el peso fresco total de las plantas de frijol a diferencias del AIA que siempre lo disminuye y el género *Rhizobium* (F7, F14) induce un incremento de la longitud de la raíz y el tallo. Los resultados alcanzados permiten la selección de cepas promisorias (A11, B4, F1 y F7) para continuar estudios en el desarrollo de estimuladores del crecimiento vegetal y lograr incrementar la producción del frijol común.

Palabras clave: bacterias promotoras del crecimiento vegetal, frijol, semillas

Selection of bacterial strains with potential the plant growth stimulator on *Phaseolus vulgaris* L. (cv. 'Lewa').

ABSTRACT

The studies involving plant growth promoting bacteria (PGPB) have been systematized over time and some methodologies have been developed for its application, including the bacteria isolation, strain classification, studies of plant-microorganism interaction, and the selection of promising strains, among others. This paper evaluates *in vitro* the growth stimulating effect of 10 bacterial strains conserved in the Inifat collection on

DrC. Yarelis Ortiz Núñez, Investigador Titular del Departamento de Agricultura Urbana y Manejo Sostenible del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT), MINAG. Calle 188 no. 38754 e/ 397 y Linderos, Santiago de las Vegas. Boyeros. La Habana. Cuba. E-mail: dpplantas@inifat.co.cu

common bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. 'Lewa') seeds. Strains of the genus *Bacillus* sp. (B3, B4, B8), *Azotobacter* sp. (A11, A20, F14) and *Rhizobium* sp. (Ciat, F1, F7, R5) do not show a significant influence on the number of germinated seed, except for the strains A11 and F7. However, they have a positive effect on the number of true leaves, specially the strain F7 with values similar to those of the IAA. Besides, the strains of the genus *Bacillus* (B4) and *Rhizobium* (F1, F7) increase the total plant fresh weight, unlike the IAA that decreases it. The strains of the genus *Rhizobium* (F7, F14) also increase the root and stem length. The results allow the selection of promising strains (A11, B4, F1 and F7) to continue the development of plant growth stimulators and increase the common bean production.

Key words: plant growth promoting bacteria, bean, seed

INTRODUCCIÓN

El desarrollo y empleo de bioestimulantes en la agricultura está siendo objeto de gran atención por parte de científicos y productores, como una alternativa para la reducción del empleo de fertilizantes químicos, con el fin de disminuir la contaminación ambiental producida por los mismos (Chen *et al.*, 2016; Calero *et al.*, 2017). En Cuba, se han venido desarrollando productos bioestimuladores entre los que se encuentran el Bioenraiz, cuyo principio activo es la hormona de crecimiento vegetal ácido indolacético (AIA), producido por la bacteria *Rhizobium* sp., la cual ejerce una acción positiva sobre la formación de las raíces y la iniciación de los pelos laterales de la raíz lo que favorece la germinación y el Biojas constituido por el ácido jasmónico (AJ), elaborado a partir del hongo *Botryodiplodia theobromae*, con un amplio espectro de respuestas fisiológicas en los cultivos (Castillo *et al.*, 2014).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB, según sus siglas en inglés) activan, en interacción con las plantas, diferentes mecanismos que incluyen además del control biológico de organismos fitopatógenos, la fijación biológica de nitrógeno atmosférico, la solubilización de nutrientes y la producción de fitohormonas (Palacio *et al.*, 2016; Rojas *et al.*, 2017). En su conjunto, estos procesos conducen a la estimulación del crecimiento vegetal y a la

mejora de la calidad de las cosechas obtenidas (Piña *et al.*, 2016). Entre las hormonas estimuladoras del crecimiento vegetal se pueden encontrar auxinas, giberelinas y citoquininas. Entre las auxinas, está el ácido indolacético (AIA), cuya producción se encuentra ampliamente distribuida entre las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) (Vega *et al.*, 2016). Se ha demostrado que parte de los efectos beneficiosos de los microorganismos están relacionados con la producción de auxinas, lo que puede afectar la iniciación de las raíces laterales, su crecimiento o ambos procesos de desarrollo, con el consiguiente aumento de la capacidad exploratoria de la planta e incrementa la toma de nutrientes.

El género *Bacillus* ha sido ampliamente utilizado en el mundo por su alta capacidad de producción de sustancias activas y por su alta resistencia a condiciones ambientales adversas. Existen cepas de esta bacteria que se reconocen como potenciadoras de la germinación y el vigor de las plántulas, las cuales favorecen el desarrollo del sistema radical en muchos cultivos (Aydi-Ben *et al.*, 2017; Kloepper *et al.*, 2017). Los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Rhizobium* también han demostrado tener una potente actividad nitro fijadora, solubilizadora de fósforo y estimuladora del crecimiento vegetal, lo que

provoca el incremento de los rendimientos en diversos cultivos (Viscardi *et al.*, 2016; Alves *et al.*, 2017).

Los estudios de las PGPB se han sistematizado y profundizado en el tiempo, llegando a elaborarse metodologías para su aplicación, que incluyen la caracterización rizosférica y endófitas, el aislamiento de bacterias, la clasificación de cepas, los estudios de interacción de microorganismos con la planta, la selección de cepas promisorias, la preparación de inoculantes microbianos y la determinación de la calidad y factibilidad económica en campo (Odoh, 2017).

En Cuba, el consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) goza de una larga tradición y gran demanda, siendo fundamental en la alimentación del pueblo, como una fuente de alternativa de proteínas y minerales; sin embargo, su producción no es suficiente, por lo que es necesario importar alrededor de 110 000 toneladas del grano cada año (Calero *et al.*, 2018). Por tal motivo, una de las prioridades de la agricultura cubana en la actualidad, es incrementar la producción de este cultivo, utilizando tecnologías que sean amigables con el medio ambiente, entre ellas el empleo de bioproductos como los bioestimuladores (Quintero *et al.*, 2018). Sin embargo, a pesar de ser este un campo prometedor, se han obtenido productos estimuladores del crecimiento vegetal a partir de unos pocos microorganismos y las producciones a mayor escala se han centrado en unos pocos géneros.

Por su parte el INIFAT cuenta con un cepario de bacterias (152 cepas) con uso potencial en la agricultura, logrando validar ocho productos en condiciones de producción (Martínez y Dibut, 2012). En los últimos años se ha diversificado la presencia de géneros bacterianos a partir de la inclusión de cepas de *Bacillus*, *Azotobacter*, *Gluconacetobacter*, *Mesorhizobium* y *Azospirillum*, aislados algunos de ellos de

ecosistemas especiales (ej: suelos ácidos y salinos). Las mismas aún se encuentran poco estudiadas y no se conoce su posibilidad real de constituir la base de nuevos productos.

El objetivo del trabajo fue evaluar en condiciones *in vitro* el efecto estimulador del crecimiento de cepas de bacterias conservadas en la colección INIFAT en semillas de frijol común (cv. 'Lewa').

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Bacterias del INIFAT. Se emplearon 10 cepas de bacterias, pertenecientes a los géneros *Bacillus* sp. (B3, B4, B8), *Azotobacter* sp. (A11, A20, F14) y *Rhizobium* sp. (Ciat, F1, F7, R5) conservadas dentro de la Colección de Bacterias Beneficiosas del INIFAT (CBBI).

Para la revitalización de las cepas bacterianas se utilizaron viales conservados en glicerol a -20° C de temperatura. Los microorganismos se sembraron por agotamiento placas de *Petri* de 90 mm con los medios de cultivo Agar Nutriente (para *Bacillus*), Asbhy (para *Azotobacter*) y YMA (para *Rhizobium*) (BioCen, 2013; Martínez *et al.*, 2006). Las colonias puras de cada cepa fueron utilizadas como inóculo para realizar el proceso fermentativo.

La fermentación de las cepas bacterianas se realizó inoculando los microorganismos en los medios de cultivo Caldo Nutriente (BioCen, 2013) (cepas de *Bacillus*), DIMARGON-M (Dibut *et al.*, 2003) (cepas de *Azotobacter*) y YMA líquido (cepas de *Rizobium*). Los medios de cultivo, una vez inoculados, se mantuvieron durante 72 horas, entre 28 y 30 °C de temperatura, en zaranda rotatoria a 150 r.p.m de agitación.

Todos los medios de cultivo utilizados en la investigación se esterilizaron durante media hora a 121 °C de temperatura y 1,5 atm de presión.

Los ensayos de estimulación del crecimiento *in vitro* de las cepas bacterianas se realizaron en el

Laboratorio de Química del INIFAT. Se emplearon semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) de la variedad comercial 'Lewa' (frijol blanco), obtenida por el INIFAT, según Catálogo de Variedades, 2014 (Fernández *et al.*, 2014) y Lista oficial de variedades comerciales, 2016.

Para los ensayos se emplearon placas *Petri* de 150 mm de diámetro esterilizadas en una autoclave vertical durante una hora a 121 °C de temperatura y 1,5 atm de presión. Las placas se prepararon con dos discos de papel de filtro en su interior, los cuales se humedecieron con agua destilada estéril antes de colocar las semillas. Se emplearon 11 tratamientos que incluyó una solución estándar de AIA a 0,1 mg.mL⁻¹ (Jiménez, *et al.*, 2019). Los controles con los medios de cultivo se utilizaron según el género bacteriano estudiado, TA para el medio DIMARGON-M, TB para el medio Caldo Nutriente, TR para el medio YMA y un testigo absoluto con agua destilada estéril (T).

Para la aplicación de los caldos microbianos y soluciones se embebieron las semillas (previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio 2 %) durante 15 min y se orearon por 30 min, según la metodología descrita por Rodríguez *et al.* (2010). Posteriormente, las semillas se colocaron en las placas *Petri* estériles (20 por placa), se pusieron destapadas dentro de bolsas nylon transparentes y fueron sometidas a condiciones de alternancia de luz (16/8 h), a 25 °C (ISTA, 1999). Se emplearon cuatro réplicas por tratamientos y controles.

Se evaluó la germinación de las semillas a las 24, 48 y 168 h de montado los ensayos (NSG 1, NSG 2, NSG 7 respectivamente). A las 96 h (4to día) se determinó el número de hojas verdaderas y al finalizar el ensayo, a las 168 h, se evaluaron las variables de crecimiento siguientes longitud de la raíz (cm), longitud del tallo (cm), número de hojas (u) y peso fresco de la planta (g) (Moeinzadeh *et al.*, 2010).

Los días de evaluación fueron determinados a partir de un estudio previo de dinámica de crecimiento realizado con el cv. 'Lewa'.

Los datos se procesaron estadísticamente mediante Análisis de Varianza con un Diseño Completamente Aleatorizado y se determinó la significación de las diferencias mediante la prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($p \leq 0,05$) (Lerch, 1987), con el empleo del programa estadístico INFOSTAT. Se comprobó la homogeneidad y normalidad de varianzas por las pruebas de Kolmogorov-Smirnov, Cochran C, Hartley y Bartlett. Este análisis se realizó por grupo microbiano, comparando las cepas pertenecientes al mismo grupo, el testigo, la solución de AIA y el medio de cultivo sin inocular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos con la aplicación de cepas de *Azotobacter* sp sobre la germinación de semillas de frijol cv. 'Lewa' se muestran en la Figura 1.

La aplicación de los tratamientos con A11 y AIA influyó positivamente sobre la germinación, al aumentar el número de semillas que germinaron al primer día posterior al montaje del experimento, aunque estos no difieren significativamente con el testigo absoluto. En los restantes días, no aparecen diferencias significativas entre los tratamientos, debido a que el número de semillas germinadas fue muy similar en todos ellos, tendencia lógica, si se tiene en cuenta que depende de las características genéticas de los cultivares.

Alcarráz *et al.* (2020) obtuvieron resultados similares al emplear una cepa de *Azotobacter* sobre dos cultivares de frijol caupí. La misma logró que el 80 % de las semillas utilizadas en los ensayos germinaran a los dos días posteriores a la siembra.

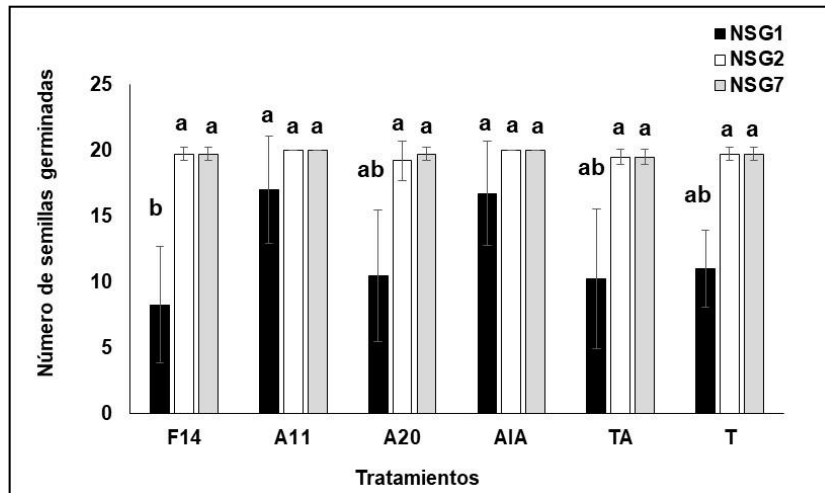


Figura 1. Efecto de la aplicación de cepas de *Azotobacter* sp. (F14, A11 y A20) y AIA sobre indicadores de la germinación en frijol 'Lewa'. TA: Testigo medio DIMARGON-M; T: Testigo agua destilada. Medias con letras distintas difieren significativamente entre sí según prueba de Rangos Múltiples de Duncan al 5 % de significación. **NSG1:** 24 hr (Esx: 0,8902); **NSG2:** 48 hr (Esx: 0,1466) y **NSG7:** 168 hr (Esx: 0,0870).

El género *Azotobacter* agrupa a bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico y estimuladoras del crecimiento vegetal, con potencialidad para producir sustancias que incrementan los indicadores de crecimiento y rendimiento de las plantas. Estas bacterias habitan normalmente asociadas a la rizosfera y son capaces de brindar sus beneficios a una amplia mayoría de las especies cultivables (Márquez *et al.*, 2016).

Específicamente en el frijol, ha sido poco evaluada la interacción entre estas bacterias y el cultivo, producto de que existen otros grupos bacterianos con una mayor afinidad con el mismo. Por ese motivo, evaluar el efecto que provoca la aplicación de bioproductos, elaborados a partir de cepas seleccionadas del mismo, constituye uno de los objetivos de este trabajo.

En cuanto al número de hojas verdaderas, indicador evaluado al cuarto día después de la germinación, solo mostró diferencias significativas el tratamiento con AIA, el cual provocó la aparición de seis hojas verdaderas,

en igual etapa que los demás (Figura 2). También las dos cepas de *Azotobacter* sp. (A 11 y A 20) lograron incrementar la presencia de hojas con cuatro nuevas. Este indicador es muy importante ya que incide directamente en el proceso de fotosíntesis y en el inicio del mismo, lo que proporciona un mayor desarrollo de las plantas en los primeros estadios. El incremento del vigor de las plantas en sus primeras etapas de desarrollo, mediante la inoculación de cepas de *A. chroococcum* ha sido estudiado por diferentes autores en varios cultivos de importancia económica como maíz, arroz, hortalizas y pastos, pero no en frijol (Obando *et al.*, 2013).

La Figura 3 muestra los resultados que se alcanzaron sobre el peso fresco total de las plantas, los mismos indican que el tratamiento con AIA disminuyó notablemente este indicador. El resto de los tratamientos no mostraron diferencias con el testigo absoluto, lo que puede deberse a que las bacterias no colonizaron eficientemente el interior de las semillas y la superficie de las raíces de estas plantas.

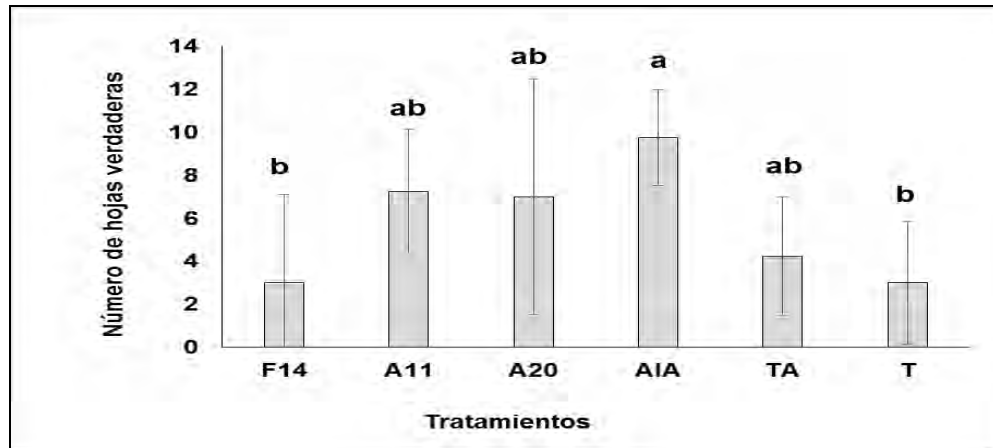


Figura 2. Efecto de la aplicación de cepas de *Azotobacter* sp. (F14, A11 y A20) y AIA sobre el número de hojas verdaderas al cuarto día posterior a la siembra. TA: Testigo medio DIMARGON-M; T: Testigo agua destilada. Medias con letras distintas difieren significativamente entre sí según prueba de Rangos Múltiples de Duncan al 5 % de significación (ESx: 0,7249).

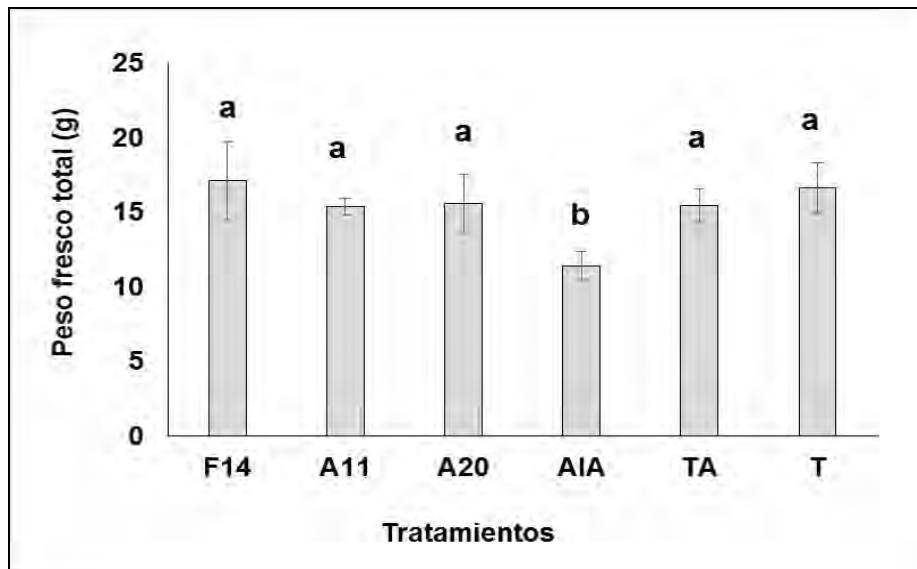


Figura 3. Efecto de la aplicación de cepas de *Azotobacter* sp. (F14, A11 y A20) y AIA sobre el peso fresco total de las plantas. TA: Testigo medio DIMARGON-M; T: Testigo agua destilada. Medias con letras distintas difieren significativamente entre sí según prueba de Rangos Múltiples de Duncan al 5 % de significación (ESx: 0,3348).

Por otra parte, las condiciones de desarrollo de estos experimentos favorecen una interacción entre las semillas y los microorganismos, pero es un ambiente donde existe un contenido de nutrientes muy bajo, por lo que es posible que

no se expresen todas las potencialidades. Este comportamiento puede atribuirse, además, a que en este período no se hayan concentrado los metabolitos que incrementan sus contenidos dentro de los tejidos de las plantas.

Los resultados que se alcanzaron sobre los indicadores de crecimiento de las plantas se muestran en la Figura 4. En la misma se aprecia que los tratamientos aplicados no incrementaron estos indicadores; sin embargo, se aprecia un mejor comportamiento con respecto al AIA, principalmente sobre la longitud del tallo.

Este comportamiento puede deberse a las condiciones en que se desarrolló el experimento y a la forma o dosis de aplicación de los caldos microbianos.

Además, en este tipo de experimentos el sustrato o medio de cultivo no aporta sustancias que actúen como nutrientes para las plantas, por lo que las mismas comienzan su crecimiento a expensas de las reservas que se encuentran en los cotiledones de las semillas. El efecto promotor del crecimiento que se logre se debe fundamentalmente a la acción de las sustancias estimuladoras del crecimiento sintetizadas por las bacterias.

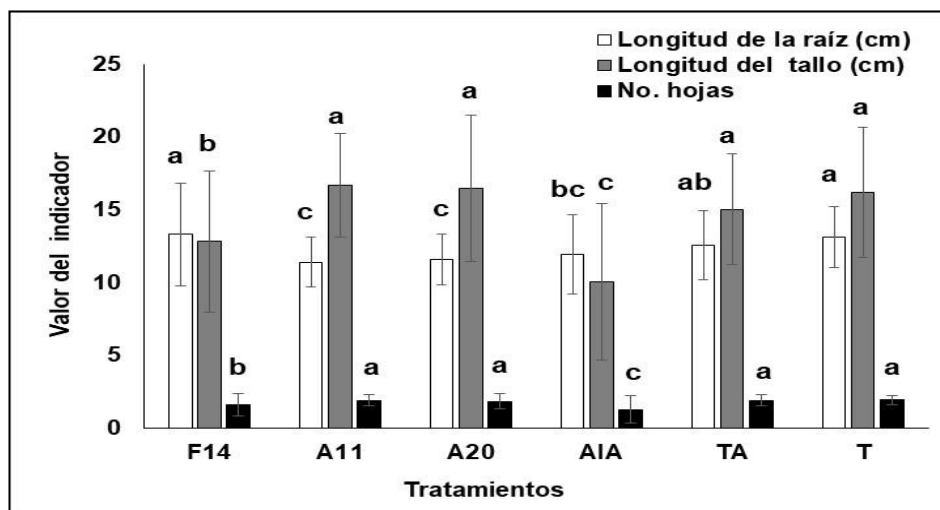


Figura 4. Efecto de la aplicación de cepas de *Azotobacter* sp. (F14, A11 y A20) y AIA sobre indicadores fisiológicos de las plantas. TA: Testigo medio DIMARGON-M; T: Testigo agua destilada. Medias con letras distintas difieren significativamente entre sí según prueba de Rangos Múltiples de Duncan al 5 % de significación (Esx: Longitud de raíz: 0,1140; Longitud del tallo: 0,1522; Número de hojas: 0,0210).

El efecto que provocó la aplicación de tres cepas de *Bacillus* sp. sobre la germinación de semillas de frijol 'Lewa' se muestra en la Figura 5. Entre estos tratamientos solo estimuló la germinación el AIA, pero sin diferencias significativas con respecto al testigo absoluto, al primer día después de sembrado el ensayo, con cinco semillas más que en el testigo absoluto. La germinación en todos los tratamientos se emparejó después del segundo día de la siembra y no existieron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados.

Con respecto al número de hojas verdaderas (Figura 6), igualmente se obtuvo una mejor respuesta en las plantas cuyas semillas se aplicaron con AIA, en las cuales se logró un incremento de seis hojas más que en el testigo absoluto.

El resto de los tratamientos, a pesar de no mostrar diferencias significativas con el testigo, también aumentaron el número de hojas, entre ellos se destacan las cepas B8 y B4 con cuatro y dos hojas más, respectivamente.

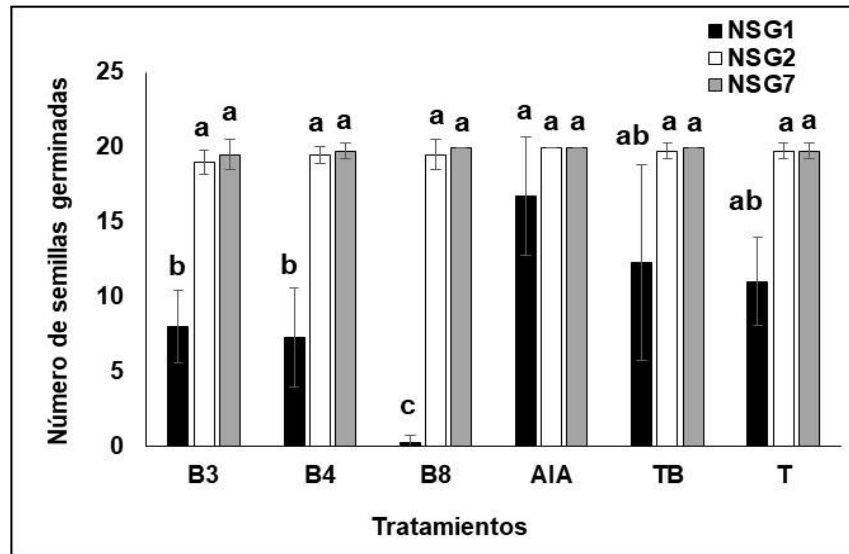


Figura 5. Efecto de la aplicación de cepas de *Bacillus* sp. (B3, B4 y B8) y AIA sobre indicadores de la germinación en frijol 'Lewa'. TB: Testigo medio Caldo Nutriente; T: Testigo agua destilada. Medias con letras distintas difieren significativamente entre sí según prueba de Rangos Múltiples de Duncan al 5 % de significación. NSG1: 24 hr (Esx: 0,7596); NSG2: 48 hr (Esx: 0,1623) y NSG7: 168 hr (Esx: 0,1020).

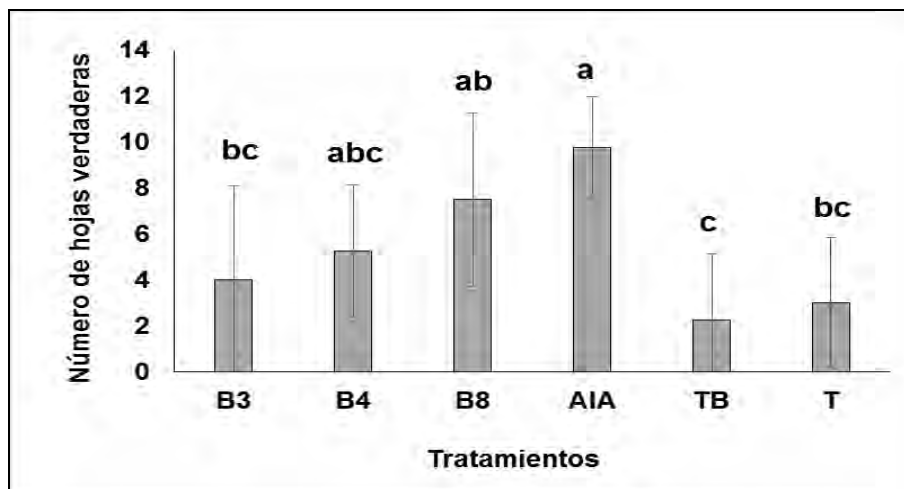


Figura 6. Efecto de la aplicación de cepas de *Bacillus* sp. (B3, B4 y B8) y AIA sobre el número de hojas verdaderas al cuarto día posterior a la germinación. TB: Testigo medio Caldo Nutriente; T: Testigo agua destilada. Medias con letras distintas difieren significativamente entre sí según prueba de Rangos Múltiples de Duncan al 5 % de significación (Esx: 0,6478).

El efecto provocado por estos mismos tratamientos sobre el peso fresco total de las plantas se observa en la Figura 7. El mismo evidencia un aumento de este indicador, en un gramo cuando se aplicó la cepa B4. El resto de las cepas no variaron los valores, pero se

comportaron mejor con respecto al AIA. Varios autores obtuvieron un aumento en el peso fresco de *Vigna radiata*, *Cucumis sativus* y *Lemna minor* al estudiar el efecto fitoestimulante de cepas de *Bacillus* spp. (Idris *et al.*, 2007; Vega *et al.*, 2016).

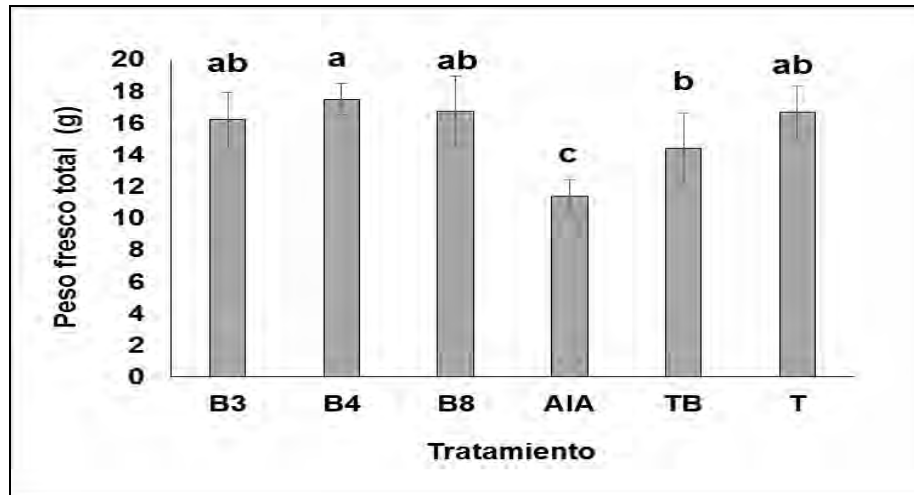


Figura 7. Efecto de la aplicación de cepas de *Bacillus* sp. (B3, B4 y B8) y AIA sobre el peso fresco total de las plantas. TB: Testigo medio Caldo Nutriente; T: Testigo agua destilada. Medias con letras distintas difieren significativamente entre sí según prueba de Rangos Múltiples de Duncan al 5 % de significación (Esx: 0,3501).

Se debe destacar que el comportamiento alcanzado en las semillas que se embebieron en el medio de cultivo que se utiliza para la reproducción de estos bioproductos no fue satisfactorio. Al primer día posterior a la siembra germinó una semilla más en él que en el testigo. Sin embargo, el número de hojas verdaderas y la masa total de las plantas fue menor en ese tratamiento con respecto al testigo absoluto, lo que supone que la promoción de la germinación y demás indicadores de crecimiento se debe a la acción de las bacterias inoculadas.

El efecto de todos estos tratamientos, sobre los principales indicadores de crecimiento se aprecia en la Figura 8. Los principales indicadores de crecimiento de estas plantas no fueron estimulados por ninguno de los tratamientos evaluados. En este caso, dos de las cepas (B3 y B4), alcanzaron valores similares a los del testigo, pero no fueron superiores. La longitud del tallo en todos los casos fue menor que la del testigo absoluto. Para el número de

hojas el tratamiento con las tres cepas evaluadas fue igual a las del testigo.

El género *Bacillus* sobresale dentro de las PGPB por su potencial como solubilizador de fosfatos y antagonista ante organismos fitopatógenos, aunque se destacan especies que fijan nitrógeno atmosférico y producen fitohormonas como el AIA (Hernández *et al.*, 2017). Por su parte, Yu *et al.* (2016) demostraron que la inoculación de bacterias de esta especie a la planta de ñame (*Dioscorea rotundata* L.) incrementó la longitud del tallo y las raíces, así como su peso fresco. Asimismo, otros autores demostraron la capacidad de producir AIA para el género en estudio, en concentraciones superiores a las obtenidas, pero con la utilización de triptófano como inductor en el medio de cultivo (Ali *et al.*, 2009), sustancia que no fue incorporada en el medio de cultivo utilizado para la multiplicación de estas cepas, lo que pudo limitar la producción de este compuesto por parte de los microorganismos.

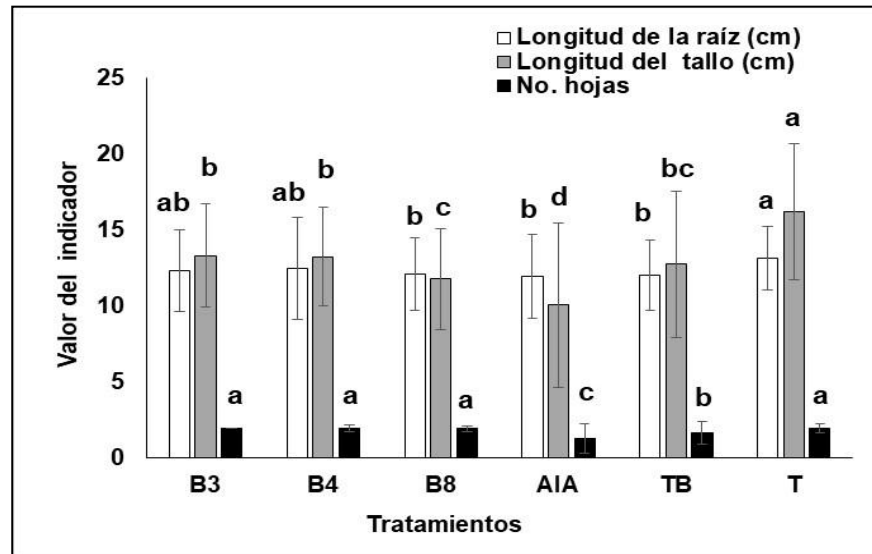


Figura 8. Efecto de la aplicación de cepas de *Bacillus* sp. (B3, B4 y B8) y AIA sobre los indicadores fisiológicos del crecimiento de frijol 'Lewa'. TB: Testigo medio Caldo Nutriente; T: Testigo agua destilada. Medias con letras distintas difieren significativamente entre sí según prueba de Rangos Múltiples de Duncan al 5 % de significación (Esx: Longitud de raíz: 0,1225; Longitud del tallo: 0,1957; Número de hojas: 0,0243).

El tratamiento con AIA y las semillas tratadas con el medio de cultivo disminuyeron el número de hojas de las plantas lo que también infiere que estos microorganismos poseen más de un mecanismo de acción para estimular el crecimiento de las plantas (Rojas *et al.*, 2016).

Cabe señalar que la aplicación de diferentes cepas bacterianas no provoca siempre la misma respuesta sobre todos los órganos de las plantas a la vez, lo que se debe fundamentalmente a la especificidad en la acción de algunos de los compuestos y exudados radicales. También en el grado en que se establezca la interacción intervienen numerosos factores, entre los que se encuentran algunos vinculados con las plantas y otros con los microorganismos.

Uno de los factores que tiene una importancia vital en el establecimiento de interacciones beneficiosas es el efecto quimiotáctico o de atracción que ejerce el cultivo sobre distintos géneros de bacterias que están en su ambiente (Pedraza *et al.*, 2020).

El efecto de cepas del género *Rhizobium* sobre los indicadores de germinación de semillas de frijol, cv. 'Lewa', se muestran en la Figura 9.

La influencia de la aplicación de las cepas sobre la germinación de las semillas no tuvo un efecto significativo. Solo se destacaron, aunque sin diferencias significativas contra el testigo absoluto, el tratamiento con AIA que logró la germinación de cinco semillas más y la inoculación de la cepa F7 donde germinó una semilla más, al primer día después de la siembra.

La germinación en todos los tratamientos fue similar después del segundo día de la siembra y no existieron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos evaluados. No obstante, Santillana *et al.* (2005) mostraron al evaluar 19 cepas de *Rhizobium* en la germinación y en el crecimiento de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), que el 47 % de sus cepas presentaron un efecto estimulante sobre la germinación de las semillas, utilizando

un medio enriquecido con triptona, factor que en este caso pudiese estar influyendo en los resultados.

En cuanto al número de hojas verdaderas al cuarto día posterior a la germinación (Figura 10), sobresalen los tratamientos con la cepa F7 y

AIA, que lograron elevar en seis este indicador y muestran diferencias significativas con respecto al testigo absoluto. El resto de las cepas y tratamientos evaluados se comportaron de modo similar al testigo, por lo tanto, no muestran diferencias significativas con respecto al mismo.

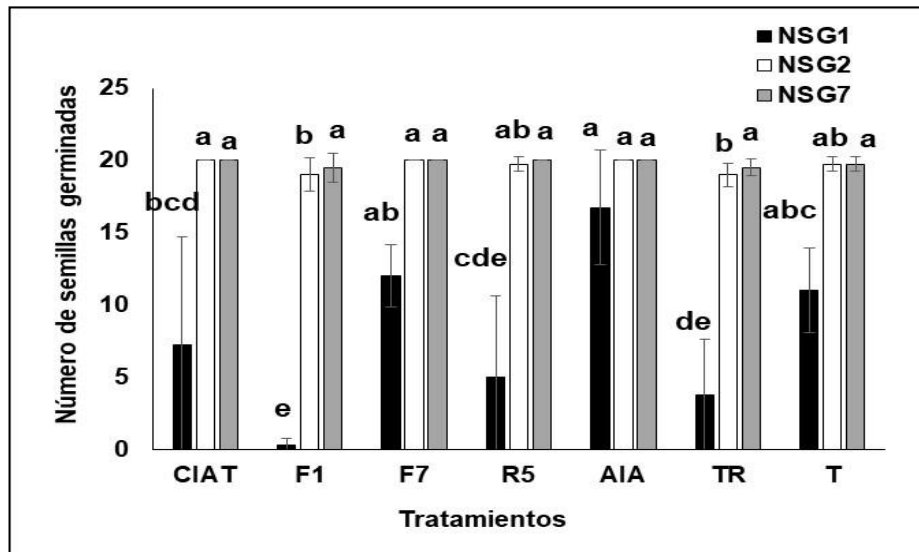


Figura 9. Efecto de la aplicación de cepas de *Rhizobium* sp. (CIAT, F1, F2 y R5) y AIA sobre indicadores de la germinación en frijol 'Lewa'. TR: Testigo medio YMA; T: Testigo agua destilada. Medias con letras distintas difieren significativamente entre sí según prueba de Rangos Múltiples de Duncan al 5 % de significación. **NSG1:** 24 hr (Esx: 0,8198); **NSG2:** 48 hr (Esx: 0,1129) y **NSG7:** 168 hr (Esx: 0,0899).

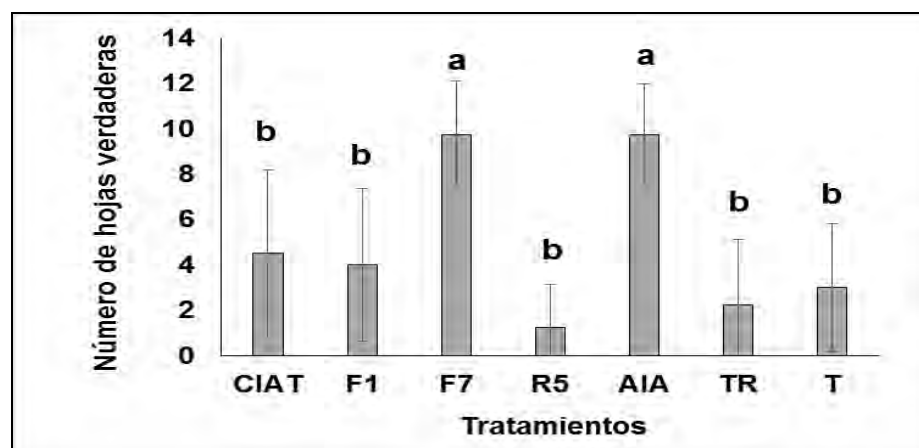


Figura 10. Efecto de la aplicación de cepas de *Rhizobium* sp. (CIAT, F1, F7 y R5) y AIA sobre el número de hojas verdaderas al cuarto día posterior a la germinación. TR: Testigo medio YMA; T: Testigo agua destilada. Medias con letras distintas difieren significativamente entre sí según prueba de Rangos Múltiples de Duncan al 5 % de significación (Esx: 0,5315).

Estos resultados corroboran los estudios realizados por Castillo (2016), donde se evidenció un efecto positivo sobre número de hojas del frijol (var. mantequilla) empleando una cepa de *Rhizobium miluonense* en condiciones controladas y de campo.

Los resultados obtenidos sobre el peso fresco total de las plantas se muestran en la Figura 11. En él se evidencia que las cepas F1 y F7 incrementaron el peso en 0,65 y 0,58 g en relación al testigo, respectivamente. Sin embargo, estos valores no representan diferencias significativas. El resto de las

variantes estudiadas no incrementó el peso de las plantas a los siete días posterior a la germinación. Castillo (2016) y Vilchez (2017) determinaron que al emplear cepas aisladas de *Rhizobium* en frijol existió un incremento de la biomasa foliar fresca y seca.

El efecto de la aplicación de estas mismas cepas sobre los indicadores fisiológicos de crecimiento se aprecia en la Figura 12. Los resultados obtenidos demuestran que la cepa F7 logró incrementar la longitud de las raíces y el tallo, con diferencias significativas con respecto al testigo.

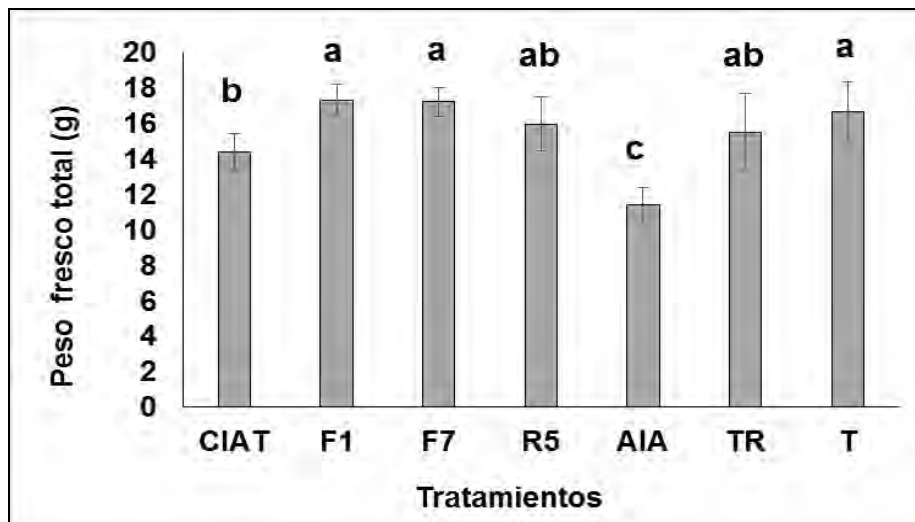


Figura 11. Efecto de la aplicación de cepas de *Rhizobium* (CIAT, F1, F7 y R5) y AIA sobre el peso fresco total de las plantas. TR: Testigo medio YMA; T: Testigo agua destilada. Medias con letras distintas difieren significativamente entre sí según prueba de Rangos Múltiples de Duncan al 5 % de significación (Esx: 0,2612).

Se debe destacar que en el caso de este género la cepa F7 demostró resultados más integrales que el resto de las cepas. La misma logró incrementar el número de semillas germinadas al primer día de la siembra. Aumentó también el número de hojas verdaderas al cuarto día después de la germinación y el peso fresco total de las plantas a los siete días. En cuanto a los

indicadores de crecimiento incrementó o igualó todas las variables evaluadas. Se debe destacar que la cepa CIAT constituye una cepa de referencia para la especie *Rhizobium*, por lo que contar con otros microorganismos que permitan obtener mejores resultados es un aspecto relevante de este trabajo.

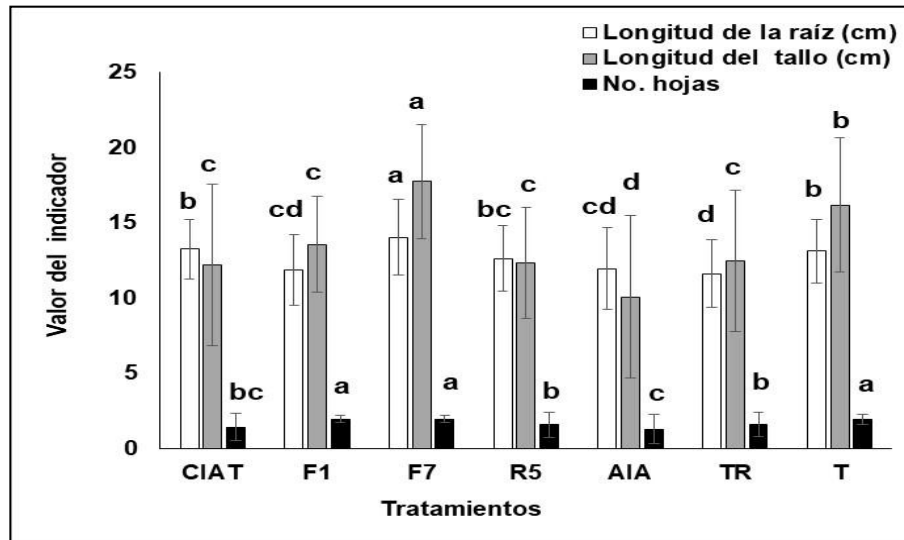


Figura 12. Efecto de la aplicación de cepas de *Rhizobium* sp. (CIAT, F1, F7 y R5) y AIA sobre los indicadores fisiológicos del crecimiento de frijol 'Lewa'. TR: Testigo medio YMA; T: Testigo agua destilada. Medias con letras distintas difieren significativamente entre sí según prueba de Rangos Múltiples de Duncan al 5 % de significación (Esx: Longitud de raíz: 0,1004; Longitud del tallo: 0,1949; Número de hojas: 0,0291).

La interacción más específica que se conoce en el mundo es la que se establece entre el frijol y otras especies de plantas leguminosas con las bacterias del género *Rhizobium* y todos los géneros afines, recientemente descritos desde el punto de vista taxonómico. Entre estas plantas y las bacterias se desarrolla una relación mutualista en la que las plantas proveen las estructuras llamadas nódulos, en las que las bacterias habitan la mayor parte de su ciclo de vida. Además, aportan los exudados radicales que sirven como fuente de energía a estos microorganismos.

Por su parte, las bacterias fijan y entregan de modo directo a las plantas hasta el 90 % del nitrógeno que estas consumen, en forma de compuestos de amonio y una amplia gama de sustancias fisiológicamente activas y fitohormonas, que participan en todas las fases fenológicas de estos cultivos (Vega *et al.*, 2016). Como consecuencia de esta relación se han alcanzado incrementos del crecimiento y el

rendimiento en frijol entre 10-25 %. Además, es posible reducir la aplicación de fertilizantes minerales hasta en 30 % durante el ciclo del cultivo.

Los resultados alcanzados permiten continuar estudios con las cepas promisorias: A11 de *Azotobacter*, B4 de *Bacillus* y F1, F7 de *Rhizobium* y llevar a cabo estudios de interacción planta-PGPB para comprobar los beneficios de esta interacción, ya que la expresión fisiológica de las bacterias en condiciones de laboratorio no siempre garantiza su actividad promotora del crecimiento en asociación con la planta (Cleiton *et al.*, 2017). Por otra parte, se podrán realizar inoculaciones combinando dichas cepas bacterianas para lograr resultados complementarios.

CONCLUSIONES

- ✓ Las cepas bacterianas en estudio no muestran una influencia significativa en

el número de semillas germinadas a excepción de las cepas A11 y F7.

- ✓ Las cepas bacterianas influyen positivamente en el número de hojas verdaderas destacándose la cepa F7.
- ✓ Las cepas de los géneros *Bacillus* (B4) y *Rhizobium* (F1 y F7) incrementan el peso fresco total de las plantas de frijol.
- ✓ Solamente el género *Rhizobium* (F7) muestra un incremento de la longitud de la raíz y el tallo, aunque el resto de los géneros tienen un mejor comportamiento que el AIA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcarraz, C.M.; Gonzáles, M.E y Heredia, J.V. (2020). *Azotobacter* y *Rhizobium* como biofertilizantes naturales en semillas y plantas de frijol caupí. Revista Avances, 22(2): 239-251. ISSN: 1562-3297.
- Alves, J.C.; Arf, O.; Ramos, A.F.; Galindo, F.S.; Nogueira, M.L.; Rodríguez, R.A.F. (2017). Irrigated wheat subjected to inoculation with *Azospirillum brasilense* and nitrogen doses as top-dressing. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, 21(8): 537-542. ISSN: 1807-1929.
- Ali, B.; Sabri, A.N.; Ljung, K. y Hasnain, S. (2009). Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phytoestimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). World Journal of Microbiology and Biotechnology, 25(3): 519–526. ISSN: 0959-3993, DOI: 10.1007/s11274-008-9918-9.
- Aydi-Ben, A.R.; Stedel, C.; Garogounis, C.; Nefzi, A.; Jabnoun, K.H.; Papadopoulou, K.K.; Daami-Remadi, M. (2017). Involvement of lipopeptide antibiotics and chitinase genes and induction of host defense in suppression of *Fusarium* wilt by endophytic *Bacillus* spp in tomato. Crop Protection, 99: 45-58. ISSN: 0261-2194
- BIOCEN (2013). Manual de Medios de Cultivo. La Habana. Centro Nacional de Biopreparados, (BIOCEN). Disponible en: www.biocen.cu. Fecha de consulta: 22/1/2014.
- Calero, A.H.; Quintero, E.R. y Pérez, Y.D. (2017). Utilización de diferentes bioproductos en la producción de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Agrotecnia de Cuba, 41(1): 17- 24. ISSN impresa: 0568-3114, ISSN digital: 2414-4673.
- Calero, A.H.; Quintero, E.R; Olivera, D.V.; Pérez, Y.D.; Castro, I.L.; Jiménez, J.; López, E.D. (2018). Respuesta de dos cultivares de frijol común a la aplicación foliar de microorganismos eficientes. Cultivos Tropicales, 39(3): 5-10. ISSN impreso: 0258-5936.
- Castillo, G.; Eng, F.; Nogueiras, C.; Michelena, G.; Sánchez, J. y Acosta, M. (2014). Caracterización del proceso fermentativo de *Lasiodiplodia theobromae* mediante cromatografía gaseosa y cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas. Revista CENIC Ciencias Químicas, 45: 90-95. ISSN (impreso): 1015-8553. ISSN (digital): 2221-2442.
- Castillo, A.C. (2016). Tesis para la Obtención del Título de Ingeniera Agrónomo: Evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. mantequilla. Universidad Nacional de Loja. Ecuador, 51 p.
- Chen, S.; Chen, D.; Cai, R.; Cui, H.; Long, Y.; Lu, Y.; Li, Ch. y She, Z. (2016). Cytotoxic and Antibacterial Preussomerins from the Mangrove Endophytic Fungus *Lasiodiplodia theobromae*. ZJ-HQ1. Journal of Natural Products, 79:2397-2402. ISSN (impreso): 0163-3864.

- Cleiton J.A.; Arf, O.; Ramos, A.F.; Galindo, F.S.; Nogueira, L.M. y Rodrigues, R.A.F. (2017). Irrigated wheat subjected to inoculation with *Azospirillum brasilense* and nitrogen doses as top-dressing. R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental, 21(8):537-542. ISSN: 1807-1929.
- Dibut, B.; Martínez, R.; Ríos, Y. y Ortega, M. (2003). DIMARGON M, nueva variante nutritiva para la producción de biofertilizantes y bioestimuladores a base de *Azotobacter*. V Encuentro de Agricultura Orgánica, Libro de Resúmenes. La Habana, Cuba. 60 p.
- Fernández, L.; Shagarodsky, T.; Cristóbal, R.; Muñoz, L.; Gil, J.F.; Sánchez, Y.; González-Chávez, M.; Moreno, V.; Fundora, Z.M.; Castiñeira, L.; León, N.; Rodríguez, A.; Acuña, G.; Walón, L. (2014). Catálogo de Variedades. INIFAT. ISBN: 978-959-7223-06-1
- Hernández, D.P.; Castellanos, M.D.; Ramos, R.Q.; Bermúdez, R.S.; González, N.P.; Isla, L.H. (2017). Empleo de rizobacterias para la protección de plantas de frijol frente al tizón ceniciento (*Macrophomina phaseolina*). Revista Centro Agrícola. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas, 44 (1):5-12. ISSN: 0253-5785.
- Idris, E.E.; Iglesias, D.J.; Talon, M. y Borriss, R. (2007). Tryptophan- dependent production of Indole- 3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Molecular Plant-Microbe Interactions, 20(6): 619-626. ISSN: 0894-0282. DOI 10.1094/ MPMI-20-6-0619.
- International Seed Testing Association (ISTA). (1999). International Rules for Seed Testing. Seed Sci. y Technol., 27, Supplement. 199 p. ISBN: 3-906-549-27-5.
- Jiménez, L.; Fonseca, M.; García, A.; Infante, S.; Vázquez, J. (2019). Efecto de diferentes concentraciones de Ácido Indolacético (AIA) en el enraizamiento *in vitro* de *Dahlia* sp. Cultivos Tropicales, 40(1). a11-e11. ISSN (impreso): 0258-5936.
- Kloepper, J.W.; Liu, K.; Newman, M.; McInroy, J.A. y Chia-Hui, H. (2017). Selection and assessment of PGPR for biological control of multiple plant diseases. Phytopathology, 107 (8):928-936. DOI: 10.1094/PHYTO-02-17-0051-R.
- Lerch, G. (1987). La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas. Ed. Academia, 226 p.
- Márquez, B.L.; Gabriel, M.P.; Balderas, L.I.; Villegas, M.J. y Sánchez, J.M. (2016). Inoculación de *Hordeum vulgare* var Armida (cebada) con *Burkholderia cepacia* y *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Investigación Agraria, 18(2):87-94. ISSN: 2305-0683.
- Martínez, R. y Dibut, B. (2012). Biofertilizantes Bacterianos. Editorial Científico-Técnica. Instituto Cubano del Libro, 279 p.. ISBN: 978-959-05-0659-8.
- Martínez, R.; López, M.; Brossard, M.; Tejeda, G.; Pereira, H.; Parra, C.; Rodríguez, J. y Alba, A. (2006). Procedimientos para el estudio y fabricación de Biofertilizantes Bacterianos. Ed. INIA - Maracay. Venezuela, 88 p.
- Moeinzadeh, A.; Sharif-Zahed, F.; Ahmadzadeh, M. y Heidari, F. (2010). Biopriming of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed with *Pseudomonas fluorescens* for improvement of seed invigoration and seedling growth. Australian Journal of Crop Science, 4(7): 564-570. ISSN: 1835-2693.
- Obando, M.; Rivera, D. y Bonilla, R. (2013). Respuesta fisiológica a la fertilización por *Azotobacter chroococcum* AC1 y fertilización nitrogenada de síntesis sobre

- el maíz (*Zea mays* L.) en Invernadero. *BioTecnología*, 17(1): 11-22. ISSN: 0188-4786.
- Odoh, K. (2017). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A bioprotectant bioinoculant for sustainable Agrobiolgy. A review. *International Journal of Advances Research in Biological Sciences*, 4 (5): 123-142. ISSN: 2348-8069. DOI: 10.22192/ijarbs.
- Palacio, R.R.; Ramos, B.P.; Coria-Arellano, J.L.; Nava, R.B. y Sáenz-Mata, J. (2016). Mecanismos de las PGPR para mitigar el estrés abiótico de plantas. *Árido-Ciencia*, 1(1):4-11. ISSN: 2594-2344.
- Pedraza, L.A.; López, C.E. y Vélez, D.U. (2020). Mecanismos de acción de *Bacillus* spp. (Bacillaceae) contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con plantas. *Acta Biol. Colomb.*, 25(1):112-125. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v25n1.7504> 5.
- Piña, J.; García, V.; Herrera, H.; Torres, J.A. (2016). Valoración de cepas silvestres de *Azospirillum* sp. y *Gluconacetobacter* sp. como promotoras de crecimiento vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(7): 1613-1623. ISSN: 2007-0934.
- Quintero, R.E.; Calero, H.A.; Pérez, D.Y.; Enríquez, G.L. (2018). Efecto de diferentes bioestimulantes en el rendimiento del frijol común. *Revista Centro Agrícola*, 45(3):73-80. ISSN (impreso): 0253-5785. ISSN (digital): 2072-2001.
- Rodríguez, S.J. (2010). Formulación de un bioproducto mixto a partir de *Azotobacter chroococcum* y *Bacillus subtilis* para el tratamiento de semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Tesis para optar por el Grado Científico de Master en Agricultura Urbana. INIFAT. La Habana, 83 p.
- Rojas, M.M.; Tejera, B.; Bosh, M.; Ríos, Y.; Rodríguez, J. y Heydrich, M. (2016). Potencialidades de cepas de *Bacillus* para la promoción del crecimiento del maíz (*Zea mays* L.). *Cuban Journal of Agricultural Science*, 50(3):485-496. ISSN (impreso): 0864-0408. ISSN (digital): 2079-3480.
- Rojas, M.M.; Sánchez, C.D.; Rosales, P.K. y Lugo, M.D. (2017). Antagonismo de *Bacillus* frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas. *Rev. Protección Veg.*, 32(2):1-9. ISSN: 2224-4697.
- Santillana, N.; Arellano, C. y Zúñiga, D. (2005). Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). *Ecología Aplicada*, 4: 1-2. ISSN (impreso): 1726-2216. ISSN (digital): 1993-9507.
- Vega, C.P.; Canchignia, M.H.; González, M. y Seeger, M. (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*, 37, no. Especial: 33-39. ISSN: 0258-5936.
- Vilchez, G.J. (2017). Capacidad antagonista y promotora del crecimiento vegetal de rizobacterias aisladas del cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis para optar el título de Ingeniero agrónomo, Lima-Perú, 125 p.
- Viscardi, S.; Ventorino, V.; Duran, P.; Maggio, A.; De Pascale, S.; Mora M. L. y Pepe O. (2016). Assessment of plant growth promoting activities and abiotic stress tolerance of *Azotobacter chroococcum* strains for a potential use in sustainable agriculture. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 16(3): 848-863. DOI:10.4067/S0718-95162016005000060.

Yu, J.; Yu, H.; Fan, Q.; Wang, H. y Liu, B. (2016). Isolation and characterization of Indole Acetic Acid producing root endophytic bacteria and their potential for

promoting crop growth. Journal of Agricultural Science and Technology, 18:1381–1391. ISSN: 1680-7073.

Fecha de recepción: 23 marzo 2021

Fecha de aceptación: 6 junio 2021

Agrotecnia de Cuba

ISSN impresa: 0568-3114

ISSN digital: 2414- 4673

<http://www.grupoagricoladecuba.gag.cu>

