

CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE PGPRs SOBRE EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE *Dioscorea rotundata* IN VITRO

Diana Beatriz Sánchez López^{1/}*, Jazmín Vanessa Pérez Pazos*

Palabras clave: *Azotobacter*; *Bacillus*; *Pseudomonas*; Auxina; biofertilizantes.

Keywords: *Azotobacter*; *Bacillus*; *Pseudomonas*; Auxine; Biofertilizers.

Recibido: 31/07/17

Aceptado: 23/02/18

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue aislar y caracterizar rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPRs, por sus siglas en inglés) nativas de la rizosfera en cultivos de *Dioscorea rotundata* de zonas productoras representativas del Caribe Colombiano como Montes de María, Sabanas Colinadas, Valle del Sinú. Además, evaluar el efecto de la inoculación de estas, a nivel de invernadero, sobre el crecimiento de plántulas in vitro de *Dioscorea rotundata*. Se determinaron características de promoción de crecimiento vegetal in vitro mediante la producción de auxinas por el método colorimétrico de Salkowsky y solubilización de fósforo. Las cepas fueron probadas a nivel invernadero en plántulas in vitro de *Dioscorea rotundata*, en las que se determinó variables de altura, longitud radicular, peso seco parte aérea y peso seco radicular. Todas las cepas presentaron la capacidad de producir auxinas y solubilizar fósforo. Se evidenció en invernadero un efecto positivo en los parámetros de crecimiento de plántulas después de 60 días de siembra, la mayoría de las cepas por zona generaron incrementos, principalmente en el peso seco radicular de las plántulas de *Dioscorea rotundata*, en comparación con el

ABSTRACT

Characterization and evaluation of PGPRs on the growth of in vitro seedlings of *Dioscorea rotundata*. The aim of this research was to isolate and to characterize native plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) in the rhizosphere of crops of *Dioscorea rotundata* from representative areas of the Colombian Caribbean such as Montes de María, Sabanas Colinadas y Valle del Sinú, and to evaluate the effect of the inoculation of these, a greenhouse level, on the in vitro seedling of *Dioscorea rotundata*. The characteristics of plant growth promotion in vitro were determined by the production of auxins by Salkowsky colorimetric method and phosphorus solubilization. The strains were tested with in vitro seedlings of *Dioscorea rotundata*, in which variables of height, root length, aerial and root dry weight, were determined. All strains can produce auxins and solubilize phosphorus. A positive effect on seedling growth parameters was observed in the greenhouse after 60 days of planting, most of the strains per zone generated increases mainly the dry root weight in the seedlings of *Dioscorea rotundata* compared to the control without inoculation, outstanding strains were as follow, *Enterobacter cloacae*

1 Autora para correspondencia. Correo electrónico: dbsanchez@corpoica.org.co

* Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica), Centro de Investigación Turipaná, Colombia.

control sin inocular, destacándose *Enterobacter cloacae* DSC6 con un incremento significativo ($p \leq 0,05$) de 147%, *Azotobacter vinelandii* DVS9 con un 126%, *Azotobacter vinelandii* DCR11 con un 108% ($p \leq 0,05$), *Brevibacillus laterosporus* DSC19 con un 96%, *Bacillus subtilis* DSC82 con un 88% ($p \leq 0,05$), *Azotobacter vinelandii* DSC72 con un 54% y *Pseudomonas denitrificans* DVS10 con un 48%. Los resultados sugirieron que los microorganismos aislados de la rizosfera tienen potencial como biofertilizantes.

INTRODUCCIÓN

El ñame (*Dioscorea* sp.) es un género de la familia *Dioscoreaceae*, con más de 600 especies (Méndez *et al.* 2013). Las dioscoreáceas constituyen una importante fuente alimentaria y están distribuidas en regiones tropicales, subtropicales y templadas de todo el mundo (Vega 2012). El género *Dioscorea* principalmente es utilizado para la alimentación humana en lugares como África, el sur de Asia, Islas del Pacífico y la región Caribe Colombiana, en donde se considera un producto básico en la dieta alimenticia de la población por presentar un alto contenido nutricional, con una fuente rica de carbohidratos, almidón, sales minerales como: el calcio, hierro, fósforo, vitamina A y C, las cuales le otorgan un valor como anti-escorbuto, también contiene riboflavina, niacina, piridoxina y carotenos. Los tubérculos poseen la mayor parte de los aminoácidos esenciales tales como: arginina, leucina, isoleucina y valina, por lo que se encuentra en menor proporción la histidina, triptófano y metionina (Vega 2012), y se convierte en un valioso alimento para el consumo humano y los animales. Entre otros usos, también es utilizado como materia prima para fines industriales, que genera empleo rural y fuente de ingresos (Vega 2012, Pinzón *et al.* 2013, Marroquín *et al.* 2016). El incremento de la demanda de este producto ha

DSC6 with a significant increase ($p \leq 0.05$) of 147%, *Azotobacter vinelandii* DVS9 with 126%, *Azotobacter vinelandii* DCR11 with 108% ($p \leq 0.05$), *Brevibacillus laterosporus* DSC19 with 96%, *Bacillus subtilis* DSC82 with 88% ($p \leq 0.05$), *Azotobacter vinelandii* DSC72 with 54% and *Pseudomonas denitrificans*, DVS10 with 48%. The results suggested that microorganisms isolated from the rhizosphere have potential as biofertilizers.

generado la necesidad de mejorar las condiciones de manejo agronómico para incrementar los rendimientos.

La agricultura actual enfrenta graves problemas de contaminación en el medio ambiente, así como disminución en la calidad de los recursos de la tierra, debido al uso excesivo de fertilizantes de síntesis químicas (Ibrahim *et al.* 2011, Abbasdokht y Gholami 2010), que aunque proporcionan nutrientes a las plantas e incrementan el rendimiento de los cultivos, el uso indiscriminado de estos genera contaminación de cuerpos de agua, además del incremento de los costos de producción y el impacto negativo en la salud humana y animal (Clavijo *et al.* 2012). Las nuevas investigaciones se han orientado hacia el desarrollo de nuevas biotecnologías enmarcadas en el manejo sostenible con el fin de reducir el impacto ambiental negativo, y en este sentido, el uso de Rizobacterias Promotoras De Crecimiento Vegetal pueden contribuir a este propósito.

Las PGPRs interactúan en el suelo al establecer relaciones variables y complejas que se traducen en la participación en los ciclos geoquímicos de nutrientes, los cuales determinan su disponibilidad para las plantas, comunidades microbianas del suelo y estimulan el desarrollo de las plantas de manera directa e indirecta, mediante relaciones benéficas (Camelo *et al.* 2011). Estos

microorganismos se encuentran en el suelo y pueden colonizar los espacios intercelulares de los tejidos radicales e incluso algunos alcanzan el tejido vascular (Achari y Ramesh 2014); entre los diversos mecanismos usados por las PGPRs, que estimulan el desarrollo vegetal, se destacan la fijación del nitrógeno atmosférico, producción de fitohormonas (auxinas, giberelinas, etileno, ácido abscísico y citoquinas), solubilización de fosfatos, síntesis de antibióticos y/o compuestos fúngicos y producción de sideróforos (Marquina *et al.* 2018, Walpola y Arunakumara 2015), mecanismos que generan un efecto benéfico y desempeñan un papel clave en la toma de nutrientes y mantenimiento de la salud radicular, que favorecen el rendimiento de los cultivos (Rives *et al.* 2007, Tahir y Sarwar 2013).

De los mecanismos usados por las PGPRs, la producción de fitohormonas como la auxina: Ácido Indol Acético (AIA) y la solubilización de nutrientes como el fósforo han sido estudiadas ampliamente (Kumar y Audipudi 2015, Ecundayo *et al.* 2016, Khalifa *et al.* 2016, Roy *et al.* 2017). El AIA promueve el desarrollo de raíces al estimular el crecimiento vegetal y son responsables de la división, expansión, diferenciación de las células y regulación de muchos parámetros fisiológicos de la planta (Martínez-Viveros *et al.* 2010, Soler *et al.* 2012). Existen reportes en donde el AIA es sintetizado por algunos microorganismos como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, entre otros, que generan incrementos en parámetros de crecimiento vegetal (Patten y Glick 1996, Egamberdiyeva 2005, Mehnaz *et al.* 2010, Barua *et al.* 2012, Khalifa *et al.* 2016). El fósforo, después del nitrógeno, es un elemento crítico para la producción agropecuaria; su disponibilidad es cada vez más limitada, debido a la progresiva insuficiencia de sus fuentes naturales y su baja movilidad si se compara con otros nutrientes (Beltrán 2014). El fósforo disponible para las plantas se encuentra en forma de ortofosfatos, que son formas inorgánicas solubles, donde se encuentran iones monobásicos ($H_2PO_4^{-1}$) y dibásicos (HPO_4^{-2}) (Banerjee *et al.* 2010). La acción de los microorganismos solubilizadores de

fosfato es esencial, ya que constituyen un grupo importante, pues están involucrados en un amplio rango de procesos que afectan la transformación del fósforo, al ser componentes integrales del ciclo edáfico de este nutriente (Beltrán 2014) y así facilitar la adquisición del nutriente por parte de las plantas e incrementar el crecimiento y su productividad; géneros como *Pseudomonas* y *Bacillus* se reportan como solubilizadores de este nutriente, al favorecer el desarrollo vegetal (Gulati *et al.* 2008, Swain *et al.* 2012, Diep y Hieu 2013, Roy *et al.* 2017). En ese contexto, el uso de microorganismos productores de AIA y con capacidad de solubilización de fosfatos representa una alternativa viable para incorporar en las tecnologías de manejo agronómico, al representar una opción amigable desde el punto de vista ambiental, la cual implementa prácticas agrícolas sostenibles.

Para la selección de PGPRs, además de la evaluación de sus capacidades como promotores de crecimiento in vitro e in vivo, conocer su identidad es fundamental para evitar seleccionar microorganismos con algún riesgo en la salud humana, por tanto, con el avance actual de la tecnología, la caracterización molecular de los microorganismos se ha convertido en una herramienta de gran utilidad. La secuenciación parcial del gen ARNr 16S se usa generalmente para la identificación bacteriana, este gen contiene regiones conservadas que proporcionan polimorfismos de secuencia que sirven como “firmas” únicas para un género o especie (Mendes *et al.* 2014, Persing *et al.* 2016), sin embargo, se ha encontrado que el grado de divergencia observado dentro de la molécula de ARNr 16S, puede no ser suficiente para distinguir algunas especies estrechamente relacionadas (Nemergut *et al.* 2013, Wang *et al.* 2018), por tanto, actualmente se utilizan otros marcadores moleculares que tienen regiones conservadas que flanquean zonas variables, las cuales permiten separar mejor a especies estrechamente relacionadas, entre estos se incluye el gen rpoB (subunidad β de ARN polimerasa) (Persing *et al.* 2016), que recientemente se utiliza como un marcador robusto para el análisis

de diversidad bacteriana a nivel intraespecífico (Gopinath *et al.* 2018, Wang *et al.* 2018).

Al tener en cuenta los anteriores argumentos, la presente investigación tiene como objetivo el aislamiento de bacterias asociadas a la rizosfera de *Dioscorea rotundata*, caracterización molecular mediante secuenciación del gen *rpoB*, caracterización de capacidades de promoción de crecimiento vegetal por producción de AIA y solubilización de fósforo y evaluación del efecto a nivel de invernadero de su inoculación sobre el crecimiento de plántulas *in vitro* *Dioscorea rotundata*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestra. Este estudio se realizó en el Centro de Investigación Turipaná (Corpoica) km 13 vía Montería-Cereté (Colombia), las coordenadas geográficas corresponden a los 8°31'16" de latitud norte y 75°58'11" de longitud oeste. Las muestras fueron tomadas a partir de suelo rizosféricos del cultivo de ñame (*Dioscorea rotundata*), en la región Caribe Colombiana y las zonas Montes de María, Sabanas Colinadas y Valle del Sinú, para un total de 15 fincas productoras representativas de este cultivo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Predios seleccionados para el aislamiento de bacterias asociadas a cultivo de ñame de la región del Caribe Colombiano.

Zonas	Código	Nombre Predio	Vereda / Corregimiento	Municipio / Departamento	Coordenadas		
					N	W	
Montes de María	Ñ05	Acapulco	Arroyo Arena	Carmen de Bolívar/ Bolívar	09°43'35"	75°09'23"	
	Ñ06	La Lucha	Caracoli Grande	Carmen de Bolívar/ Bolívar	09°44'24"	75°13'28"	
Sabanas Colinadas	Ñ01	Quita Sueño	Los Algarrobos	Chinú/Sucre	09°09'39"	75°23'53"	
	Ñ02	Nueva Esperanza	Los Algarrobos	Chinú/Sucre	09°11'37"	75°23'54"	
	Ñ03	Parcela 3	Mateo Pérez	Sampués/Sucre	09°21'69"	75°38'14"	
	Ñ04	Florida	Segovia	Sampués/Sucre	09°10'59"	75°22'44"	
	Ñ07	El Rosario	Las Tinias	Corozal /Sucre	09°17'9.0"	75°19'8.0"	
	Ñ08	Puerta Roja	Las Palmas	Corozal/Sucre	09°15'47"	75°20'29"	
	Ñ09	San Rafael	Las Nubes	San Antero/Córdoba	09° 20'48"	75° 47'48"	
	Ñ10	Marbella	Las Nubes	San Antero/Córdoba	09° 20'51"	75° 47'40"	
	Ñ11	Guasimal	Guasimal	San Antero/Córdoba	09°20'47"	75° 45'17"	
	Ñ12	Sol y Sombra	Mosquito	San Antero/Córdoba	09°20'10"	75° 44'52"	
	Ñ13	Villa Marela	Bonguita	San Antero/Córdoba	09° 21' 24"	75° 45'41"	
	Ñ14	Padilla	Bajo Grande	San Antero/Córdoba	09° 20'24"	75° 45'49"	
	Valle Del Sinú	Ñ15	C.I Turipaná	Retiro de los indios	Cereté/Córdoba	08°50'48"	75°48'57"

Las muestras de suelo fueron tomadas aplicando un patrón sistemático de muestreo en forma de X, se tomaron 5 puntos en cada lote de la rizosfera a una profundidad de 20 cm, determinada por las raíces del cultivo

entre 150-200 gr de suelo. Las muestras se almacenaron en bolsas plásticas, refrigeradas y transportadas al Laboratorio de Microbiología Agrícola del C.I. Turipaná para su procesamiento.

Aislamientos. Se tomó una muestra de 10 g de suelo y se diluyó en 90 ml de NaCl estéril al 0,85%, con una agitación de 100 rpm durante 15 min. Se realizaron diluciones seriadas con base 10 desde 10^{-1} hasta 10^{-7} , se inoculó 0,1 ml en medios de cultivo Agar Triptona Soya (TSA)[®] para aislamientos de mesófilos arábicos y medio King B (King *et al.* 1954) para aislamientos de *pseudomonas*; para aislamientos de *Azotobacter* se utilizó medio Ashby, en el que se realizó la siembra de gránulos de suelo en cajas Petri (Fenglerowa 1965). Las colonias puras obtenidas de cada aislamiento fueron conservadas en viales con medio aceite mineral estéril (Carrillo *et al.* 1998).

Determinación de la actividad PGPR_s in vitro de los aislados. La cuantificación química de la auxina: ácido indol acético (AIA) se realizó en un medio de cultivo líquido con K-lactato y suplementado de triptófano a 100 mg.l⁻¹ (Sánchez *et al.* 2012). El pH fue ajustado a un valor de 7,0 y esterilizado a 121°C durante 15 minutos; los caldos inoculados por triplicado con las cepas fueron incubados durante 72 h a 150 rpm en la oscuridad. La determinación de la producción del AIA se llevó a cabo por método colorimétrico al utilizar el reactivo de Salkowski preparado a partir de cloruro férrico en ácido sulfúrico (FeCl₃·7H₂O 12 g.l⁻¹ en H₂SO₄ 7,9M) en una relación 1:1 con la suspensión bacteriana, se dejó reaccionar durante 30 min en oscuridad (Glickmann y Deessaux 1995) y se realizó la lectura a una absorbancia de 450 nm.

La determinación cuantitativa de solubilización de fósforo se hizo en medio líquido SRSM-PR modificado con roca fosfórica al 0,5% como fuente de fósforo (g.l⁻¹: glucosa 10; extracto de levadura 0,5; NH₄(SO₄)₂ 0,50; KCl 0,2; MgSO₄·7H₂O 0,3; MnSO₄·7H₂O 0,004; FeSO₄·7H₂O 0,2; pH: 7,2). Los aislamientos se cultivaron en caldo SRSM-PR e incubaron durante 5 días a 150 rpm, posteriormente 24 ml de los cultivos se centrifugaron a 3,000 rpm, al emplear 0,5 ml del sobrenadante. La medición y lectura se realizó mediante la técnica de azul de fosfomolibdeno a una absorbancia de 712 nm (Fiske y Subbarow 1925).

Para la prueba de compatibilidad todas las cepas fueron cultivadas en erlenmeyer durante 24 h y ajustadas a una OD₅₄₀ = 0,500, posteriormente, la primera cepa se colocó en placas de agar LB y se cultivaron durante 5 días a 30°C. La segunda cepa se diluyó el caldo en agar LB [1,5% (peso / vol)] y enfrió a una temperatura de 30°C y luego se vertió en placas hasta solidificación, luego, se cortaron trozos de la segunda cepa y se voltearon sobre la primera cepa. Después del crecimiento durante 24 horas a 30°C, se observaron las placas, la presencia de halos indicó incompatibilidad de las cepas (Shank *et al.* 2011).

Caracterización molecular de los aislamientos. Se realizó mediante la amplificación y secuenciación del gen rpoB. La extracción de ADN de las bacterias seleccionadas se realizó con el kit QIAamp[®] DNA Mini and Blood Mini Handbook de QUIAGEN (Alemania) a partir de una suspensión bacteriana cultivada en medio Luria Bertani (LB) toda la noche. La amplificación del gen rpoB se realizó al seguir las instrucciones del fabricante, mediante el Kit PCR Master Mix (ThermoScientific). Los primers utilizados en la PCR fueron rpoB1698f (59-AACATCGGTTTGATCAAC-3) y rpoB2041r (59-CGTTGCATGTTGGTACCCAT-3) (Dahllof *et al.* 2000). La PCR se realizó en un termociclador Multigene Optimax de Labnet. El programa para la PCR fue como sigue: denaturación a 94°C por 3 minutos, seguido por 10 ciclos de denaturación a 94°C por 1 minuto, alineación a 50°C por 1,5 minutos, extensión por 2 minutos a 72°C seguido, por 25 ciclos de denaturación por 1 minuto a 94°C, alineación a 50°C por 1,5 minutos y extensión por 2 minutos a 72°C y una extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR se enviaron para su secuenciación a Macrogen-Korea. Las secuencias obtenidas se limpiaron y ensamblaron en una secuencia consenso que fue alineada con secuencias de la base de datos GenBank del NCBI, mediante la herramienta BLASTn.

Con las secuencias obtenidas se realizó el análisis filogenético en el software MEGA7

(Kumar *et al.* 2016), las secuencias se alinearon mediante el programa MUSCLE (Edgar 2004), las distancias evolutivas se calcularon al utilizar el método de máxima verosimilitud compuesta (Tamura *et al.* 2004) al tener en cuenta transiciones y transversiones. La construcción del árbol filogenético se infirió al usar el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei 1987) y la evaluación del árbol se realizó mediante el método Bootstrap con 1000 permutaciones para asignar niveles de confianza a los nodos en el árbol (Felsenstein 1985).

Evaluación en invernadero de aislamientos asociados al cultivo de ñame espino (*Dioscorea rotundata*) por su promoción de crecimiento. El experimento se mantuvo bajo condiciones de invernadero con plántulas de ñame espino de *Dioscorea rotundata* obtenidas in vitro, según protocolo descritos por Quintero *et al.* (2003), estas plántulas in vitro fueron ubicadas en invernadero durante 8 días con riego constante para su aclimatación y sembradas en bandejas de 28 alveolos (Figura 1).

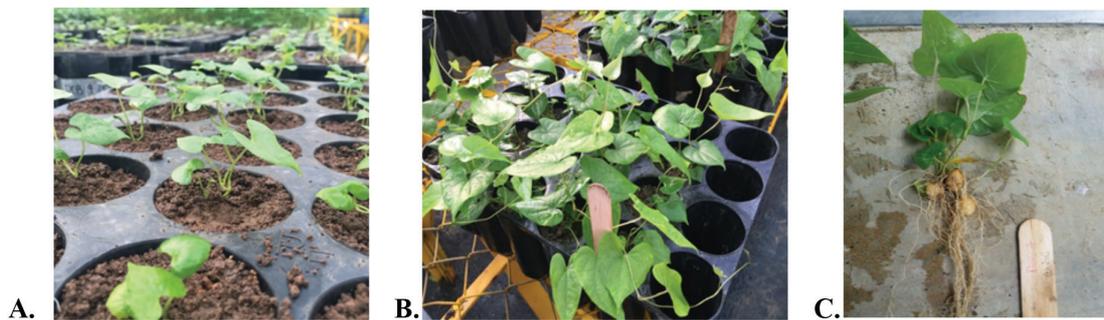


Fig. 1. A. Plántulas ñame in vitro en proceso de aclimatación en invernadero. B. Plantas de ñame a los 60 días de establecidas en el invernadero. C. Raíces de las plantas de ñame con minitubérculos.

Se utilizó un suelo sin esterilizar, procedente de las zonas donde fueron aisladas las bacterias: Montes de María, el suelo exhibía una textura franco arcillosos, pH=5,89; 3,23% MO; 3,48 P (mg.kg⁻¹); 0,24 K; 7,54 Mg; 20,95 Ca (Cmol.kg⁻¹). Sabanas Colinadas, el suelo mostraba una textura franco limoso, pH=6,46; 2,02% MO; 2,69 P (mg.kg⁻¹); 0,36 K; <1,00 Mg; 21,74 Ca (Cmol.kg⁻¹) y Valle Del Sinú, el suelo presentaba una textura franco arcillosos, el suelo pH=6,58; 1,42% MO; 5,87 P (mg.kg⁻¹); 6,49 K; 0,43 Mg; 16,26 Ca (Cmol.kg⁻¹).

Se empleó un diseño completamente al azar con 5 repeticiones por tratamiento con (3 plantas/unidad experimental). Se determinó un control sin inocular para cada zona. Las plántulas fueron inoculadas 2 veces a los 8 días de establecido el experimento y a los 30 días directamente al suelo con 5 ml de suspensión

bacteriana medida con una absorbancia a 540 nm, correspondiente a una población bacteriana de 10⁸ UFC.ml⁻¹ en medio nutritivo (g.l⁻¹: glucosa 0,5; extracto de levadura 0,5; peptona 0,5; caseína 0,5; almidón 0,5; K₂HPO₄ 0,30; MgSO₄ 0,05; 17,0 pH: 7). Se realizó el muestreo destructivo a los 60 días y se evaluó las variables de respuesta: altura de la parte aérea y radical (cm), masa seca de la parte aérea y radical (g).

Análisis estadístico. Los datos fueron sometidos a una evaluación estadística al emplear un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey con 95% de confianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento, selección y caracterización molecular de bacterias asociadas a rizosfera

de *Dioscorea* sp. Se aislaron un total 106 morfotipos bacterianos, se seleccionaron 19 morfotipos con características asociadas a los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter* y *Rhizobium*,

los cuales fueron caracterizados molecularmente mediante la amplificación y secuenciación del gen *rpoB* (Cuadro 2), el árbol filogenético generado a partir del análisis de las secuencias se presenta en la Figura 2.

Cuadro 2. Caracterización molecular de cepas bacterianas aisladas de la rizosfera de cultivos de *Dioscorea rotundata*.

Zona	Cepa Bacteriana	Identificación Molecular	% De Identidad	# De Accesoión
Montes de María	DCB9	<i>Azotobacter vinelandii</i>	98%	CP005095.1
	DCB12	<i>Azotobacter chroococcum</i>	88%	CP010415.1
	DCB13	<i>Enterobacter cloacae</i>	99%	CP009756.1
Sabanas Colinadas	DCR11	<i>Azotobacter vinelandii</i>	99%	CP005095.1
	DCR13	<i>Azotobacter vinelandii</i>	98%	CP005095.1
	DCR21	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	96%	HE798556.1
	DSC1	<i>Bacillus licheniformis</i>	98%	CP014781.1
	DSC6	<i>Enterobacter cloacae</i>	99%	CP009756.1
	DSC10	<i>Enterobacter asburiae</i>	99%	CP011591.1
	DSC17	<i>Enterobacter cloacae</i>	99%	CP009756.1
	DSC18	<i>Enterobacter cloacae</i>	99%	CP009756.1
	DSC19	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	99%	CP007806.1
	DSC21	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	99%	CP007806.1
Valle Del Sinú	DSC62	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	94%	CP004143.1
	DSC72	<i>Azotobacter vinelandii</i>	99%	CP005095.1
	DSC82	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	CP011534.1
	DSC85	<i>Rhizobium</i> sp.	98%	HG518322.1
	DVS9	<i>Azotobacter vinelandii</i>	99%	CP005095.1
	DVS10	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	96%	CP004143.1

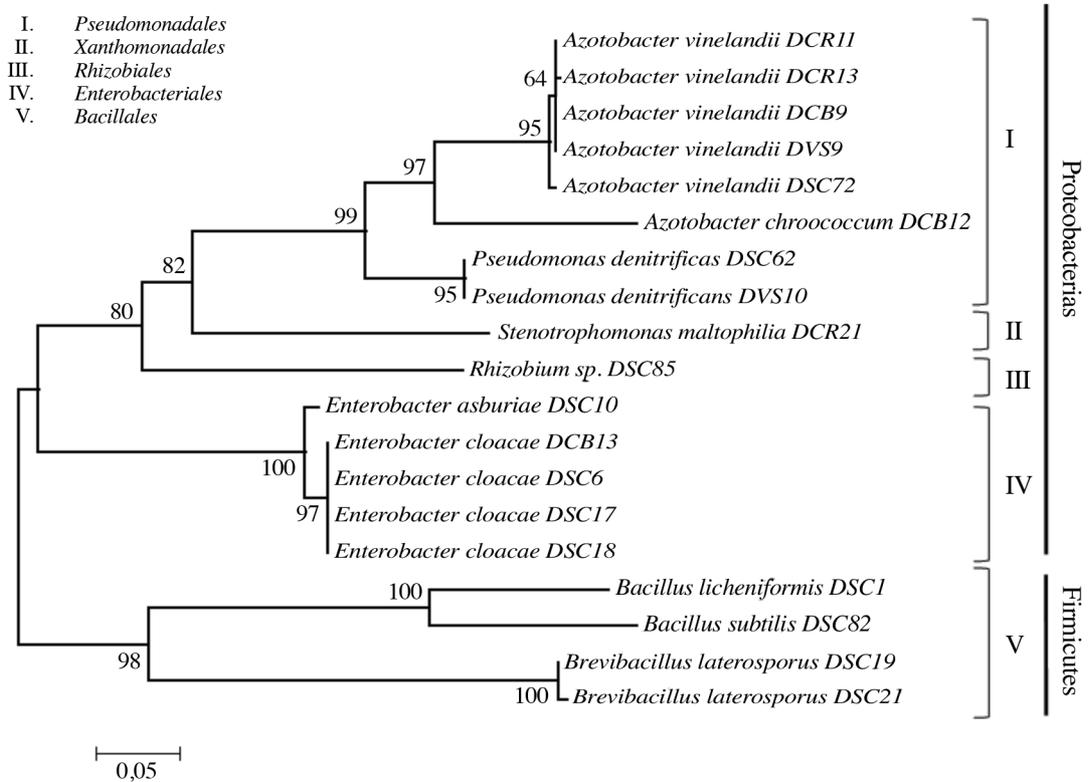


Fig. 2. Árbol filogenético generado por el método Neighbor-Joining basado en el gen *rpoB* para 19 cepas bacterianas aisladas de la rizosfera de *Dioscorea rotundata* de zonas productoras del Caribe Colombiano con características de promoción de crecimiento vegetal evaluadas in vitro y en invernadero.

El árbol filogenético (Figura 2) está dibujado a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol, las cuales se encuentran en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis involucró 19 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían lagunas y datos faltantes. El porcentaje de árboles replicados en el que los taxones asociados se agruparon en la prueba Bootstrap (1000 réplicas) se muestran junto a los nodos en el árbol.

En términos generales, la secuenciación del gen *rpoB* permite diferenciar las bacterias obtenidas por grupos correspondientes a sus características

biológicas, más que por su procedencia. El 79% de los microorganismos aislados se agrupan por pertenecer al Phylum Proteobacterias, que es un grupo diverso de bacterias Gram negativas, dentro de este amplio grupo, los microorganismos se distribuyen en los órdenes *Xanthomonadales*, *Rhizobiales*, *Enterobacteriales* y *Pseudomonadales* (Figura 2), este último grupo es al que pertenecen el mayor número de aislados obtenidos en este estudio. El 21% de microorganismos restantes se agrupan por pertenecer al Phylum Firmicutes, que son las bacterias Gram positivas con bajo contenido G+C (<50%), los microorganismos pertenecen a clase Bacilli, Orden Bacillales y se diferencian en 2 grupos correspondientes a la división a nivel

de género que se puede observar en el árbol filogenético (Figura 2). Todos los géneros encontrados en esta investigación han sido reportados como PGPRs con capacidad para favorecer el crecimiento, rendimiento y calidad de los cultivos (Selvakumar *et al.* 2012, Ahemad y Kibret 2014, Kumar y Audipudi 2015, Ecundayo *et al.* 2016, Khalifa *et al.* 2016, Pérez y Sánchez 2017, Roy *et al.* 2017).

Determinación de la actividad PGPRs in vitro de las cepas bacterianas

Se realizaron pruebas de habilidades de promoción de crecimiento in vitro, como la producción de AIA y solubilización de fósforo a las 19 bacterias seleccionadas y caracterizadas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Determinación de la actividad promoción de crecimiento in vitro a cepas bacterianas de la rizosfera de cultivos de *Dioscorea rotundata*.

Zona	Cepa Bacteriana	Identificación Molecular	(AIA) ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Fosfatos Disponible (ppm)
Montes De María	DCB9	<i>Azotobacter vinelandii</i>	24,29 \pm 1,30	18,94 \pm 0,42
	DCB12	<i>Azotobacter chroococcum</i>	27,70 \pm 4,77	15,90 \pm 0,56
	DCB13	<i>Enterobacter cloacae</i>	101,42 \pm 1,57	15,1 \pm 0,33
Sabanas Colinadas	DCR11	<i>Azotobacter vinelandii</i>	67,62 \pm 7,45	18,68 \pm 0,31
	DCR13	<i>Azotobacter vinelandii</i>	37,39 \pm 3,15	14,36 \pm 0,40
	DCR21	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	46,59 \pm 4,84	19,03 \pm 1,32
	DSC1	<i>Bacillus licheniformis</i>	35,15 \pm 1,36	18,18 \pm 0,19
	DSC6	<i>Enterobacter cloacae</i>	63,25 \pm 4,54	16,78 \pm 0,41
	DSC10	<i>Enterobacter asburiae</i>	28,05 \pm 0,9	10,96 \pm 0,09
	DSC17	<i>Enterobacter cloacae</i>	25,52 \pm 2,40	18,32 \pm 1,42
	DSC18	<i>Enterobacter cloacae</i>	49,01 \pm 1,31	18,88 \pm 0,88
	DSC19	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	7,06 \pm 0,98	18,58 \pm 0,68
	DSC21	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	25,09 \pm 0,46	19,03 \pm 1,32
	DSC62	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	18,72 \pm 4,64	18,37 \pm 0,32
	DSC72	<i>Azotobacter vinelandii</i>	19,92 \pm 0,70	7,19 \pm 0,12
	DSC82	<i>Bacillus subtilis</i>	7,59 \pm 0,36	20,78 \pm 1,14
	DSC85	<i>Rhizobium</i> sp.	25,98 \pm 1,18	18,40 \pm 0,84
	Valle Del Sinú	DVS9	<i>Azotobacter vinelandii</i>	25,71 \pm 2,11
DVS10		<i>Pseudomonas denitrificans</i>	67,93 \pm 0,89	21,92 \pm 0,19

Los resultados obtenidos muestran que las cepas presentan algunos mecanismos directos de promoción de crecimiento in vitro como la producción de AIA y solubilización de fósforo, los cuales contribuyen de manera positiva al crecimiento de las plantas inoculadas y las convierte en una alternativa para mejorar los cultivos, que evitan el abuso de fertilizantes de síntesis químicas.

Las cepas bacterianas que presentaron los mayores valores de AIA fueron *Enterobacter cloacae* (DCB13) aisladas de la zona de Montes de María con $101,42 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, valor muy cercano al reportado por Khalifa *et al.* (2016), que indica que la cepa promotora de crecimiento vegetal *Enterobacter cloacae* MSR1 aislada de alfalfa alcanzó un valor de AIA de $112,00 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. En el Valle del Sinú se destacó la bacteria *Pseudomonas denitrificans* (DVS10) con una producción de AIA de $67,93 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, Egamberdiyeva (2005), reporta cepas de *Pseudomonas denitrificans* positivas para la producción de AIA, entre otros estudios para este género bacteriano. Malik y Sindhu (2011) reportan que la cantidad de AIA producida por aislados de *Pseudomonas* varía en un rango de $10,20$ a $31,20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, valores inferiores a los obtenidos en esta investigación con la cepa DVS10.

La cepa *Azotobacter vinelandii* (DCR11), aislada de la zona de Sabanas Colinadas, alcanzó una producción de AIA in vitro de $67,62 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, valor superior al reportado por Barua *et al.* (2012), por una cepa de referencia de *Azotobacter vinelandii* (MTCC 2460), que alcanzó una producción de AIA de $23,16 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, de igual forma, el valor de AIA obtenido por la cepa DCR11 fue superior al reportado por Lara *et al.* (2014) en sus estudios realizados en la zona del Valle del Sinú del Caribe Colombiano, en donde las bacterias más eficientes en la producción de AIA fueron del género *Azotobacter*, donde se destacó la cepa A14 de la zona de San Carlos con el mayor valor de $44,276$ y las cepas SN1 y S32 de la zona de San Pelayo con $39,342 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y $37,209 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ respectivamente.

Por último, se destaca que la cepa aislada de la zona de Sabanas Colinadas era de *Stenotrophomonas maltophilia* (DCR21), con una producción AIA de $46,59 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, lo cual es un valor superior a lo reportado por Mehnaz *et al.* (2010), quienes encontraron que las cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* aisladas de caña de azúcar mostraron las más bajas producciones de AIA en un rango de $0,30$ a $6,00 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, en contraste a estos resultados Kumar y Audipudi (2015) reportaron que la cepa *Stenotrophomonas maltophilia* AVP27 presentó una producción de AIA de $93,0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, valor superior al obtenido para la cepa DCR21 en esta investigación, sin embargo, este resultado puede atribuirse a la cantidad de triptófano usado en el medio de cultivo. Para el caso de Kumar y Audipudi (2015) utilizaron $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de triptófano, mientras que en esta investigación se utilizó $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Se ha informado que la producción de AIA por bacterias puede variar entre los diferentes géneros y especies, y también está influenciada por condiciones de cultivo, la etapa de crecimiento y la disponibilidad de sustrato (Sánchez *et al.* 2012).

Todas las bacterias presentaron la capacidad de sintetizar AIA, la cual es una auxina natural que se encuentra presente en la mayoría de las plantas; estas auxinas son hormonas vegetales que regulan diversos procesos del desarrollo vegetal. La síntesis de estas sustancias resulta de gran importancia, ya que la aplicación de estas bacterias puede constituir una alternativa viable en el contexto de una agricultura ecológica (Castillo *et al.* 2005), se perfilan a las bacterias aisladas de la rizosfera de ñame que son potenciales promotoras de crecimiento vegetal.

La solubilización de fósforo, medida como la disponibilidad de ortofosfatos a partir de roca fosfórica, se encuentra en un rango de 7 - 21 ppm. Para la zona del Valle del Sinú se destaca la bacteria *Pseudomonas denitrificans* (DVS10) con el mayor valor de solubilización de fósforo de $21,92$ ppm, resultados que sustentan lo afirmado por Roy *et al.* (2017), quienes plantean la solubilización de fósforo como una característica de esta especie bacteriana. Otros estudios realizados por

Gulati *et al.* (2008) mencionan que este género bacteriano *Pseudomonas* presenta la capacidad de solubilizar diferentes fuentes de fosfatos (tricalcico y roca fosfórica), en el que se destaca la cepa *Pseudomonas* BIHB que presentó solubilización en un rango de 8,05 ppm a 0,06 ppm, valores inferiores a los obtenidos con la cepa DVS10 en esta investigación.

En la zona de Sabanas Colinadas se destacan diferentes cepas aisladas. La cepa *Bacillus subtilis* (DSC82) logró solubilizar hasta 20,78 ppm, valor que se encuentra dentro del rango reportado por Swain *et al.* (2012), quienes indican la capacidad de solubilización de fosfatos en cepas de *Bacillus subtilis* en el rango de 20 a 30 ppm, de igual forma, Diep y Hieu (2013) reportan que cepas de *Bacillus subtilis* alcanzan valores de 19,01 ppm.

La cepa *Brevibacillus laterosporus* (DSC21) presentó capacidad de solubilizar in vitro hasta un valor de 19,03 ppm, resultados que apoyan lo obtenido por Ecundayo *et al.* (2016), que reportan cepas de *Brevibacillus laterosporus* con capacidad para solubilizar fósforo de tipo inorgánico por la disminución del pH en el medio de cultivo NBRIP. Los resultados obtenidos para la cepa *Stenotrophomonas maltophilia* (DCR21) indican que fue capaz de solubilizar fósforo a partir de roca fosfórica hasta un valor de 19,03 ppm. Según Gomes *et al.* (2014) la *Stenotrophomonas maltophilia* es capaz de solubilizar fósforo en un rango de 46-79 ppm a partir de roca fosfórica, resultados superiores a los obtenidos en esta investigación, lo que sugiere que esta especie bacteriana tiene una alta capacidad de solubilización

de fósforo y está ampliamente reportada como solubilizadora de fósforo (Liba *et al.* 2006, Xiao *et al.* 2009).

Las bacterias relacionadas en el experimento fueron capaces de solubilizar la roca fosfórica presente en medio de cultivo in vitro, estas bacterias pueden ser una alternativa para los suelos agrícolas que, aunque contienen grandes cantidades de P, se encuentran en formas no asimilables que pueden ser solubilizados por estos grupos bacterianos (Restrepo-Franco *et al.* 2015).

Los resultados de compatibilidad indican que existe competencia entre cepas evaluadas, por tanto, no se deben mezclar en Montes de María las cepas DCB12-DCB13, en Sabanas Colinadas DCR11-DCR14, DSC1-DSC6, DSC17-DSC19, DSC18-DSC19 y DSC62-DSC72.

Como se puede observar en el Cuadro 4, la inoculación de las bacterias genera un efecto en los parámetros de crecimiento de plántulas de ñame después de 60 días de establecidas en invernadero. Los resultados evidenciaron que la inoculación con algunas bacterias de este estudio influyó positivamente sobre la longitud de la parte aérea de las plantas, para la zona Montes de María en la localidad del Carmen de Bolívar, la cepa *Azotobacter vinelandii* (DCB9) presentó un incremento 28% respecto al control sin inocular. En la zona de Sabanas Colinadas en localidad de corozal, la *Stenotrophomonas maltophilia* (DCR21) presentó diferencias significativas ($p \leq 0,05$) de 106% respecto al control sin inocular. En la localidad de Chinú, la cepa *Enterobacter cloacae* (DSC17) presentó un incremento del 36%.

Cuadro 4. Respuesta vegetal a la inoculación de bacterias aisladas de la rizosfera de *Dioscorea rotundata* en invernadero.

Zona	Localidad	Cepa Bacteriana	Longitud Aérea (cm)	Longitud Radical (cm)	Peso Seco Aéreo (g)	Peso Seco Radical (g)
Montes De María	Carmen De Bolívar	Control	26,77 ^a	15,66 ^a	0,24 ^a	0,050 ^a
		DCB9	34,40 ^a	16,58 ^a	0,25 ^a	0,048 ^a
		DCB12	26,75 ^a	15,31 ^a	0,21 ^a	0,053 ^a
		DCB13	26,16 ^a	18,40 ^a	0,27 ^a	0,062 ^a
Sabanas Colinadas	Corozal	Control	26,68 ^b	19,00 ^a	0,35 ^b	0,36 ^b
		DCR11	19,81 ^b	16,98 ^{ab}	0,34 ^b	0,75 ^a
		DCR13	16,14 ^b	15,29 ^b	0,48 ^{ab}	0,60 ^{ab}
		DCR21	55,19 ^a	18,06 ^{ab}	0,54 ^a	0,55 ^{ab}
	Chinú	Control	17,19 ^{ab}	18,59 ^{ab}	0,20 ^b	0,21 ^b
		DSC1	31,21 ^a	21,47 ^a	0,31 ^{ab}	0,40 ^{ab}
		DSC6	9,10 ^b	20,01 ^{ab}	0,29 ^{ab}	0,52 ^a
		DSC10	12,83 ^b	17,73 ^b	0,33 ^a	0,40 ^{ab}
Sabanas Colinadas	Sampués	Control	55,94 ^{ab}	20,09 ^a	0,40 ^a	0,29 ^a
		DSC17	76,47 ^a	19,92 ^a	0,57 ^a	0,39 ^a
	Sampués	DSC18	48,47 ^{ab}	18,73 ^a	0,53 ^a	0,44 ^a
		DSC19	43,43 ^b	19,07 ^a	0,52 ^a	0,57 ^a
		DSC21	44,26 ^b	17,52 ^a	0,52 ^a	0,41 ^a
	San Antero	Control	46,43 ^a	22,39 ^a	0,45 ^{ab}	0,42 ^b
		DSC62	42,73 ^a	20,81 ^a	0,47 ^{ab}	0,62 ^{ab}
		DSC72	29,95 ^{ab}	21,73 ^a	0,50 ^{ab}	0,65 ^{ab}
		DSC82	15,00 ^b	19,96 ^a	0,33 ^b	0,79 ^a
		DSC85	38,44 ^{ab}	22,15 ^a	0,52 ^a	0,59 ^{ab}
Valle del Sinú	Cereté	Control	33,69 ^a	21,31 ^a	0,45 ^a	0,23 ^b
		DVS9	32,88 ^a	18,83 ^{ab}	0,39 ^{ab}	0,52 ^a
		DVS10	26,76 ^a	18,32 ^b	0,28 ^b	0,34 ^a

Medias con letras no comunes dentro de cada variable difieren estadísticamente según prueba de Tukey para $p \leq 0,05$ ($n=15$).

Con respecto a la longitud radicular en los Montes de María en la localidad de la zona del Carmen de Bolívar *Azotobacter vinelandii* (DCB9) presentó un incremento del 6%, al igual que la cepa *Enterobacter cloacae* (DCB13) con incrementos del 17% con respecto al control sin inocular. En la zona de Sabanas Colinadas en la localidad Chinú, la cepa *Bacillus licheniformis* (DSC1) presentó incrementos en la longitud radicular del 15%, respecto al control sin inocular, la cepa *Enterobacter cloacae* (DSC6) logró incrementos del 7% con respecto al cultivo sin inocular en esta misma localidad (Cuadro 4). Estas PGPRs estimulan y modifican los procesos fisiológicos de las plantas, al incrementar el desarrollo de raíces adventicias y pelos absorbentes, los cuales son importantes para la absorción del fósforo, significativas en el empleo de la agricultura (Vazallo *et al.* 2013).

Se observó que la variable denominada peso seco aéreo, localizada en Carmen de Bolívar, mostró incrementos en la cepa *Azotobacter vinelandii* (DCB9) con un 4% respecto al control sin inocular. La cepa *Enterobacter cloacae* (DCB13) también presentó incrementos de un 12% con respecto al control sin inocular. En la zona de Sabanas Colinadas en localidad de Corozal *Azotobacter vinelandii* (DCR13) presentó incrementos 140% con respecto al control sin inocular y la cepa *Stenotrophomonas maltophilia* (DCR21) presentó diferencias significativas ($p \leq 0,05$) de 170%. En la localidad de Chinú el *Bacillus licheniformis* (DSC1) generó un crecimiento del 55% al compararlo con el control sin inocular. En Sampués la cepa *Brevibacillus laterosporus* (DSC21) presentó incrementos del 30% en referencia con el control sin inocular. En San Antero se destacaron la cepa de *Rhizobium* sp. (DSC85) con aumentos de 15%, la cepa *Azotobacter vinelandii* (DSC72) con 11% y *Pseudomonas denitrificans* (DSC62) con 4% a partir del testigo sin inocular (Cuadro 4).

La mayoría de las cepas por zona presentaron incrementos, principalmente el peso seco radicular de las plántulas de ñame en comparación con el control sin inocular, con la excepción

del *Azotobacter vinelandii* (DCB9) que fue inferior en este parámetro, según el control sin inocular. Para la zona de los Montes de María con la inoculación de *Enterobacter cloacae* (DCB13) se logró un crecimiento de 24% en el peso seco radicular (Cuadro 4). Para la zona de Sabanas Colinadas en la localidad de Corozal se destaca la bacteria *Azotobacter vinelandii* (DCR11) con un incremento significativo ($p \leq 0,05$) de 108% en el peso seco radical. La bacteria *Enterobacter cloacae* (DSC6) de Chinú generó un aumento significativo ($p \leq 0,05$) de 147% en peso radicular sobre el control sin inocular, para Sampués se logró un crecimiento de 96% con la inoculación de la bacteria *Brevibacillus laterosporus* (DSC19) y para San Antero la inoculación de *Bacillus subtilis* (DSC82) permitió un aumento significativo ($p \leq 0,05$) de 88% y con la inoculación de la cepa *Azotobacter vinelandii* (DSC72) se alcanzó el 54% en el peso seco radical de los tubérculos (Cuadro 4). Para la zona del Valle del Sinú con la inoculación de las 2 cepas se obtuvo un incremento estadísticamente significativo ($p \leq 0,05$) en el peso seco radicular de ñame al alcanzar un 126% con la inoculación de *Azotobacter vinelandii* (DVS9) y un 48% con la inoculación de *Pseudomonas denitrificans* (DVS10) (Cuadro 4).

El incremento del peso seco radicular con la inoculación de bacterias es un reflejo directo de la actividad promotora de crecimiento de estos microorganismos, resultados similares en *Dioscorea rotundata* fueron reportados por Swain *et al.* (2007), quienes encontraron un efecto positivo de *Bacillus subtilis* en el peso seco radicular al alcanzar un incremento máximo de 76% respecto al control sin inocular, valor inferior al encontrado en este estudio con la bacteria DSC82 (Cuadro 4).

Respecto al resto de bacterias evaluadas, Arcos y Zúñiga (2016) reportaron que la inoculación de la bacteria *Bacillus* Bac17M8, suplementada con materia orgánica, presenta rendimientos superiores en 145,69%, en comparación al control no inoculado en la papa variedad *Ccompis*; Naqqash *et al.* (2016) informaron que la inoculación con *Enterobacter* sp. TN38 produjo efectos positivos significativos en los

parámetros de crecimiento al alcanzar aumentos máximos de 76% en la raíz. En esta investigación se obtuvieron incrementos superiores en el peso seco de tubérculos de ñame de hasta 147% con la inoculación de *Enterobacter cloacae*, en comparación a los obtenidos en papa con cepa del mismo género bacteriano.

CONCLUSIONES

Se aislaron 19 rizobacterias potenciales como biofertilizantes asociadas al cultivo de ñame (*Dioscorea* sp.), pertenecientes a subregiones Montes de María, Sabanas Colinadas y Valle del Sinú; las cuales fueron identificadas para Montes de María (*Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter chroococcum* y *Enterobacter cloacae*), Sabanas Colinadas (*Bacillus licheniformis*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Azotobacter vinelandii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Azotobacter chroococcum*, *Brevibacillus laterosporus*, *Pseudomonas denitrificans*, *Bacillus subtilis* y *Rhizobium* sp.) y Valle del Sinú (*Azotobacter vinelandii* y *Pseudomonas denitrificans*); las cuales sintetizan auxinas y solubilizan fósforo al facilitar la promoción del crecimiento y desarrollo de la plantas de ñame, lo cual sería una alternativa prometedoras como biofertilizantes para este cultivo y una agricultura sostenible al tener en cuenta que disminuiría el impacto sobre el medio ambiente al reducir el uso excesivo de fertilizantes de síntesis química.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Colombiano bajo el convenio TV15 con Corpoica y al laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigación Turipaná.

LITERATURA CITADA

- Abbasdokht, H; Gholami, A. 2010. The effect of seed inoculation (*Pseudomonas putida* + *Bacillus lentus*) and different levels of fertilizers on yield and yield components of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. World Academy of Science Engineering and Technology 68:979-983.
- Achari, GA; Ramesh, R. 2014. Diversity, biocontrol, and plant growth promoting abilities of xylem residing bacteria from solanaceous crops. International journal of microbiology (14):1-14.
- Ahemad, M; Kibret, M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. Journal of King Saud University-Science 26(1):1-20.
- Arcos, J; Zúñiga, D. 2016. Rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas con capacidad para mejorar la productividad en papa. Revista Latinoamericana de la Papa 20(1):18-31.
- Banerjee, S; Palit, R; Sengupta, C; Standing, D. 2010. Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. Isolated from tomato rhizosphere. Australian Journal of crop science 4(6):378-383.
- Barua, S; Tripathi, S; Chakraborty, A; Ghosh, S; Chakrabarti, K. 2012. Characterization and crop production efficiency of diazotrophic bacterial isolates from coastal saline soils. Microbiological research 167(2):95-102.
- Beltrán, PME. 2014. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria 15(1):101-113.
- Camelo, M; Vera, SP; Bonilla, RR. 2011. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria 12(2):159-166.
- Carrillo, A; Puente, M; Castellanos, T; Bashan, Y. 1998. Aplicaciones biotecnológicas de ecología microbiana. Manual de Laboratorio. Pontificia Universidad Javeriana, Santafé de Bogotá, Colombia-Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, Baja California Sur, México. 51 p.
- Castillo, G; Altuna, B; Michelena, G; Sánchez-Bravo, J; Acosta, M. 2005. Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. In Anales de Biología 27:137-142.
- Clavijo, C; Chipana, V; Centeno, J; Zúñiga, D; Guillén, C. 2012. Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo

- de Olea europea" olivo" en Tacna Perú. *Ecología Aplicada* 11(2):89-102.
- Dahllof, I; Baillie, H; Kjelleberg, S. 2000. rpoB-Based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology* 66(8):3376-3380.
- Diep, CN; Hieu, TN. 2013. Phosphate and potassium solubilizing bacteria from weathered materials of denatured rock mountain, Ha Tien, Kiên Giang province Vietnam. *American Journal of Life Sciences* 1(3):88-92.
- Ecundayo, EA; Ogongusi, TA; Ogunmefun, OO; Alegbe, MO; Oso, AO. 2016. Screening of soil isolates from soil samples for solubilization of inorganic phosphate. *International research of journal of biological science* 5(8):1-6.
- Edgar, RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* 32(5):1792-1797.
- Egamberdiyeva, D. 2005. Plant-growth-promoting rhizobacteria isolated from a Calcisol in a semi-arid region of Uzbekistan: biochemical characterization and effectiveness. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168(1):94-99.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39(4):783-791.
- Fenglerowa, W. 1965. Simple method for counting *Azotobacter* in soil samples. *Acta Microbiológica Polonica* 14(2):203-206.
- Fiske, C; Subbarow, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry* 66:375-400.
- Glickman, E; Dessaux, Y. 1995. A critical examination of the specificity of the salkowsky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 61(2):793-796.
- Gomes, EA; Silva, UDC; Marriel, IE; De Oliveira, CA; Lana, UGDP. 2014. Rock phosphate solubilizing microorganisms isolated from maize rhizosphere soil. *Revista brasileira de Milho e Sorgo* 13(1):69-81.
- Gopinath, GR; Chase, HR; Gangiredla, J; Eshwar, A; Jang, H; Patel, I; Yoo, Y. 2018. Genomic characterization of malonate positive Cronobacter sakazakii serotype O: 2, sequence type 64 strains, isolated from clinical food, and environment samples. *Gut pathogens* 10(1):1-11.
- Gulati, A; Rahi, P; Vyas, P. 2008. Characterization of phosphate-solubilizing fluorescent pseudomonads from the rhizosphere of seabuckthorn growing in the cold deserts of Himalayas. *Current microbiology* 56(1):73-79.
- Ibrahim, M; Yamin, M; Sarwar, G; Anayat, A; Habib, F; Ullah, S. 2011. Tillage and farm manure affect root growth and nutrient uptake of wheat and rice under semi-arid conditions. *Applied Geochemistry* 26:194-197.
- Khalifa, AY; Alsyceh, AM; Almalki, MA; Saleh, FA. 2016. Characterization of the plant growth promoting bacterium, *Enterobacter cloacae* MSR1, isolated from roots of non-nodulating Medicago sativa. *Saudi journal of biological sciences* 23(1):79-86.
- King, E; Ward, M; Raney, D. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluoresce J. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44:301-307.
- Kumar, NP; Audipudi, V. 2015. Exploration of a novel plant growth promoting bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* AVP27 isolated from the chilli rhizosphere soil. *International Journal of Engineering Research and General Science* 3:265-276.
- Kumar, S; Stecher G; Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33(7):1870-1874.
- Lara, C; Oviedo, L; Betancur, C. 2014. Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indol acético para mejorar los pastos. *Zootecnia tropical* 29(2):187-194.
- Liba, CM; Ferrara, FIS; Manfio, GP; Fantinatti-Garborggini, F; Albuquerque, RC; Pavan, C; Barbosa, HR. 2006. Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. *Journal of applied microbiology* 101(5):1076-1086.
- Malik, DK; Sindhu, SS. 2011. Production of indole acetic acid by *Pseudomonas* sp. effect of coinoculation with *Mesorhizobium* sp. Cicer on nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*). *Physiology and Molecular Biology of Plants* 17(1):25-32.
- Marquina, EM; Ramírez, Y; Castro, Y. 2018. Efecto de bacterias rizosféricas en la germinación y crecimiento del pimentón *Capsicum annum* L. Var. cacique gigante. *Bioagro* 30(1):3-16.
- Marroquín, NG; Rodríguez, SLB; Gutiérrez, YAP; Hurtado, GB. 2016. Caracterización molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de plantas de ñame de la Costa Atlántica Colombiana utilizando la técnica "DNA Amplification Fingerprinting (DAF)". *Revista Colombiana de Biotecnología* 18(1):95-103.

- Martínez-Viveros, O; Jorquera, MA; Crowley, DE; Gajardo, G; Mora, ML. 2010. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of soil science and plant nutrition* 10(3):293-319.
- Mehnaz, S; Baig, DN; Lazarovits, G. 2010. Genetic and phenotypic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sugarcane plants growing in Pakistan. *J. Microbiol. Biotechnol* 20(12):1614-1623.
- Méndez, YP; Palencia, JL; Hernández, KP; Hernández, EJ; Beltrán, JD. 2013. Reaction of yam genotypes (*Dioscorea* spp.) to anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Revista Temas Agrarios* 18(1):34-40.
- Mendes, LW; Kuramae, EE; Navarrete, AA; Van Veen, JA; Tsai, SM. 2014. Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. *The ISME Journal* 8(8):1577-1587.
- Naqqash, T; Hameed, S; Imran, A; Hanif, MK; Majeed, A; Van Elsas, JD. 2016. Differential response of potato toward inoculation with taxonomically diverse plant growth promoting rhizobacteria. *Frontiers in plant science* 7:1-12.
- Nemergut, DR; Schmidt, SK; Fukami, T; O'Neill, SP; Bilinski, TM; Stanish, LF; Knelman, JE; Darcy, JL; Lynch, RC; Wickey, P; Ferrenberg, S. 2013. Patterns and processes of microbial community assembly. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77(3):342-356.
- Patten, CL; Glick, BR. 1996. Bacterial biosynthesis of Indole-3-acetic acid (review). *Canadian Journal of Microbiology* 42:207-220.
- Pérez-Pazos, JV; Sánchez-López, DB. 2017. Characterization and effect of *Azotobacter*, *Azospirillum* and *Pseudomonas* associated with *Ipomoea Batatas* of Colombian Caribbean. *Revista Colombiana de Biotecnología* 19(2):35-46.
- Persing, DH; Tenover, FC; Hayden, RT; Ieven, M; Miller, MB; Nolte, FS;... Belkum, AV. 2016. *Molecular microbiology: diagnostic principles and practice* (3 eds.). American Society for Microbiology (ASM), Washington, USA. Cabi. 825 p.
- Pinzón, Y; Bustamante, S; Buitrago, G. 2013. Diagnóstico molecular diferencial *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum* en ñame (*Dioscorea* sp.). *Revista Colombiana de Biotecnología* 17(1):52-60.
- Quintero, I; Polo, J; Jarma, A; Espitia, A. 2003. Enraizamiento in vitro de *Dioscoreas* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología* 5(2):51-56.
- Restrepo-Franco, GM; Marulanda-Moreno, S; de la Fe-Pérez, Y; Díaz-de la Osa, A; Lucia-Baldani, V; Hernández-Rodríguez, A. 2015. Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista Cenic Ciencias Biológicas* 46(1):63-76.
- Rives, N; Acebo, Y; Hernández, A. 2007. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Perspectivas de su uso en Cuba Cultivos Tropicales* 28(2):29-38.
- Roy, M; Saha, S; Das, J. 2017. Synergetic effect of different free-living diazotrophic bacteria, P-solubilizing bacteria and *Rhizobium* on growth of *Oryza sativa* L. (cv. NDR-359). *Indian Journal of Agricultural Research* 51(3):221-226.
- Saitou, N; Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4(4):406-425.
- Sánchez, D; Gómez, R; Garrido, M; Bonilla, R. 2012. Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas* 3(7):1401-1415.
- Selvakumar, G; Reetha, S; Thamizhiniyan, P. 2012. Response of biofertilizers on growth, yield attributes and associated protein profiling changes of blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper). *World Applied Sciences Journal* 16(10):1368-1374.
- Shank, E; Klepac, V; Collado, L; Powers, G; Losick, R; Kolter, R. 2011. Interspecies interactions that result in *Bacillus subtilis* forming biofilms are mediated mainly by members of its own genus. *PNAS* 108(48):1236-1243.
- Soler, AJ; Gilchrist, E; Pérez, NJC. 2012. Evaluation of microorganisms with potential for plant growth promotion and biological control of *Spongopora subterranea*. *Revista Colombiana de Biotecnología* 14(1):157-170.
- Swain, MR; Laxminarayana, K; Ray, RC. 2012. Phosphorus solubilization by thermotolerant *Bacillus subtilis* isolated from cow dung microflora. *Agricultural Research* 1(3):273-279.
- Swain, MR; Naskar, SK; Ray, RC. 2007. Indole-3-acetic acid production and effect on sprouting of yam (*Dioscorea rotundata* L.) minisets by *Bacillus subtilis* isolated from culturable cowdung microflora. *Polish Journal of Microbiology* 56(2):103-110.
- Tahir, M; Sarwar, MA. 2013. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A budding complement of synthetic fertilizers for improving crop production. *Pakistan Journal of Life and Social Sciences* 11:1-7.
- Tamura, K; Nei, M; Kumar, S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining

- method. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 101(30):11030-11035.
- Vazallo, SN; Ramírez, LT; Carranza, LT; García, BZ; Bernilla, BS. 2013. Efecto de la inoculación de *Rhizobium etli* y *Trichoderma viride* sobre el crecimiento aéreo y radicular de *Capsicum annum* var. longum. Revista Rebiolest 1(1):11-21.
- Vega, MEG. 2012. Revisión bibliográfica el ñame (*Dioscorea* spp.). Características, usos y valor medicinal. aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo. Cultivos Tropicales 33(4):5-15.
- Walpolo, BC; Arunakumara, K. 2015. Assessment of phosphate solubilization and indole acetic acid production in plant growth promoting bacteria isolated from green house soils of gonju-gun, South Korea. Tropical Agricultural Research and Extension 18(1):31-39.
- Wang, XL; Cui, WJ; Feng, XY; Zhong, ZM; Li, Y; Chen, WX; Tian, CF. 2018. Rhizobia inhabiting nodules and rhizosphere soils of alfalfa: A strong selection of facultative microsymbionts. Soil Biology and Biochemistry 116:340-350.
- Xiao, CQ; Chi, RA; He, H; Zhang, WX. 2009. Characterization of tricalcium phosphate solubilization by *Stenotrophomonas maltophilia* YC isolated from phosphate mines. Journal of Central South University of Technology 16(4):581-587.



Todos los derechos reservados. Universidad de Costa Rica. Este artículo se encuentra licenciado con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr