

Artículo científico

Caracterización e interacciones entre bacterias con propiedades promotoras de crecimiento vegetal asociadas al cultivo de arroz

Characterization and interactions between rice-associated bacteria with plant-growth promoting properties

G. Rariz*; A. Martínez; L. Ferrando; R. J. Menes; A. Fernández Scavino

Laboratorio de Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental, Cátedra de Microbiología, Departamento de Biociencias Facultad de Química y Facultad de Ciencias, Universidad de la República. General Flores 2124. CP 11800. Montevideo, Uruguay.

* Autor de correspondencia: grariz@fq.edu.uy

Resumen

El arroz (*Oryza sativa*) es uno de los principales rubros de exportación agrícola de Uruguay. Actualmente resulta imprescindible potenciar el desempeño del cultivo para incrementar los rendimientos. Las Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (BPCV) son una alternativa para obtener mayores rendimientos y cultivos sustentables por reducción del uso de agroquímicos. El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar bacterias diazotrofas y solubilizadoras de fosfato asociadas al cultivo de arroz y determinar su comportamiento *in vitro* frente a otras BPCV. El ensayo se realizó en fitotrón sembrando semillas en suelos de diferente origen y características. Se obtuvieron 90 aislamientos de bacterias endófitas y rizosféricas. Se evaluó la actividad diazotrófica mediante Ensayo de Reducción de Acetileno y amplificación del gen *nifH*. La diversidad de los aislamientos se analizó por ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) y la identificación por secuenciación parcial del gen 16S rRNA. Las bacterias endófitas diazotrofas no solubilizaron fosfato y pertenecen a los géneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter*, *Paenibacillus* y *Pleomorphomonas*. Todas las bacterias rizosféricas solubilizadoras de fosfato pertenecen al género *Burkholderia* y son diazotrofas. La mayoría de los aislamientos produce sideróforos y ácido indolacético. Se observó que algunas cepas de *Burkholderia* antagonizan *in vitro* a BPCV de los géneros *Azospirillum* y *Herbaspirillum* que se emplean como inoculantes en gramíneas. Estos resultados indican que la flora nativa que tiene propiedades benéficas y se asocia al cultivo en diferentes suelos puede incidir en el éxito de la inoculación con las BPCV.

Palabras clave: bacterias, endófitas, rizosféricas, arroz, antagonismo.

Abstract

Rice (*Oryza sativa*) is one of the main cereals exported by Uruguay. Nowadays it is imperative to improve the performance of the cropping system to increase the yields. The PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria) are an option to raise the yields and to reach sustainable production by reducing the agrochemicals input. The goal of this work was to isolate and characterize rice-associated bacteria able to fix atmospheric nitrogen or solubilize inorganic phosphate, and to study their performance *in vitro* facing to other PGPB. Soils from different regions and properties were employed to grow rice from seeds, under controlled conditions. Ninety isolates of endophytic and rizospheric bacteria were obtained. Diazotrophic activity was assessed by ARA (Acetylene Reduction Assay) and *nifH* gene amplification. The diversity of the isolates was screened by ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) and the identification was performed by partial sequencing of the 16S rRNA gene. The endophytic diazotrophic bacteria were unable to solubilize phosphate and belong to the genera *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter*, *Paenibacillus* and *Pleomorphomonas*. All the rizospheric phosphate-solubilizing isolates are diazotrophs and affiliated to the genus *Burkholderia*. Most of the characterized isolates produce siderophores and indolacetic acid. Some strains of *Burkholderia* were antagonists *in vitro* of PGPB of the genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum* that are employed as inoculants in grasses. These results show that the native beneficial bacteria associated to the plant from different soils may influence the success of the inoculation with PGPB.

Key words: bacteria, endophytic, rhizospheric bacteria, rice, antagonism.

Introducción

El arroz es una planta monocotiledónea que pertenece a la familia de las gramíneas. Su cultivo es de origen milenario y proviene de las regiones húmedas de Asia tropical y subtropical. Hasta el momento se han reportado 19 especies, de las cuales *Oryza sativa* es la de mayor consumo (FAO, 2004; Rives, 2006).

Actualmente se ha convertido en uno de los principales rubros de exportación para Uruguay, donde el 95 % de la cosecha se exporta. Aunque es un cultivo con altos rendimientos en el país, la demanda constante impulsa el uso intensivo del suelo para obtener aún mayores rendimientos. Para esto es necesario el uso de nuevas tecnologías que potencien el desempeño de los cultivos y mejoren la utilización de los nutrientes con un adecuado margen de seguridad alimentaria y ambiental. Las bacterias con capacidad de promover el crecimiento vegetal son una alternativa viable para obtener cultivos sustentables y reducir el uso de agroquímicos (ACA, 2010).

Las BPCV (Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal) pueden estar asociadas a la rizósfera o a los tejidos de la planta (endófitas). Las bacterias endófitas desarrollan parte de su ciclo de vida en el interior de la planta sin causar síntomas de daño en ella, colonizando los alrededores de las células de la epidermis, la exodermis y las células del córtex (Hallmann *et al.*, 1997; Reinhold-Hurek y Hurek, 1998). Se ha postulado que las bacterias asociadas al cultivo pueden tener un impacto importante en la productividad de los cultivos de interés agronómico porque estimularían el crecimiento de la planta mediante mecanismos directos e indirectos. Los directos incluyen la fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas, solubilización de fosfatos inorgánicos, mineralización de fosfatos orgánicos, solubilización y movilización de hierro mediante sideróforos y la supresión de la producción de etileno mediante la producción de la enzima ácido 1-aminociclopropano 1 carboxílico (ACC) deaminasa. Los indirectos incluyen la degradación de compuestos tóxicos, inhibición de actividad patógena de algunos hongos y antagonismo frente a bacterias patógenas (Li *et al.*, 2009; van der Lelie *et al.*, 2009).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno (diazótrofas) son muy estudiadas dentro de las disciplinas microbiológicas asociadas a la agricultura y ecología. Esto se debe a su capacidad de convertir el nitrógeno atmosférico en una forma asimilable por la planta como es el amonio. La asociación planta-bacteria aumenta la velocidad de creci-

miento y el rendimiento de la planta en peso fresco, contenido de materia seca y peso de grano. Para el estudio de estas comunidades bacterianas, se ha utilizado como marcador funcional el gen *nifH*, que codifica para la dinitrogenasa reductasa, proteína que forma parte del complejo nitrogenasa responsable del proceso de Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN). Luego del nitrógeno, el fósforo (P) es uno de los minerales esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas y es el segundo fertilizante químico más utilizado en el mundo. Muchas veces el P es el nutriente limitante para la producción de biomasa en los ecosistemas naturales. Si bien el suelo es la mayor fuente de P, no todo se encuentra de forma asimilable (P inorgánico) por las plantas y esto depende fuertemente del pH, entre otros factores. Para poder utilizar el P, las bacterias han desarrollado mecanismos de solubilización y mineralización, los más conocidos son la excreción de ácidos orgánicos y de fosfatasa respectivamente.

Varios estudios han demostrado que la inoculación con hongos y bacterias solubilizadoras de P pueden incrementar el rendimiento o el crecimiento de las plantas, tanto en condiciones de invernadero como en condiciones de campo (Chuang *et al.*, 2007; Vassilev *et al.*, 2007; Valverde *et al.*, 2007; Wasule *et al.*, 2007; Widada *et al.*, 2007). Se observó, que con frecuencia, la combinación de microorganismos con diferentes características, tales como solubilizadores de P combinados con diazótrofos o con hongos micorrízicos arbusculares, arrojan efectos superiores a la inoculación solo con bacterias solubilizadoras de fosfato (Valverde *et al.*, 2007; Babana y Antoun, 2007). El hierro, micronutriente esencial para mayoría de seres vivos, es un nutriente limitante en el suelo ya que se oxida rápidamente y solo queda disponible bajo la forma Fe^{3+} o hidróxidos insolubles (Harrington y Crumbliss, 2009). Por esto, las bacterias han desarrollado mecanismos de captación que involucran una gran diversidad de agentes quelantes (sideróforos) de Fe^{3+} que son liberados al ambiente para luego ser reconocidos a nivel de membrana e internalizados para su uso (Faraldo, 2007).

Otros compuestos importantes en la promoción de crecimiento son las fitohormonas, dentro de las cuales las auxinas desempeñan un rol central en la división, extensión y diferenciación de las células y los tejidos vegetales, siendo el ácido 3-indolacético (AIA) su principal representante (Tsavkelova *et al.*, 2006).

A pesar de la capacidad que pueda tener una bacteria para promover el crecimiento vegetal, el éxito de la inoculación de un cultivo con éstas,

depende tanto de factores bióticos como abióticos. Los factores bióticos como el genotipo de la planta y el ambiente son elementos muy importantes a la hora de formular inoculantes (García de Salamone y Döbereiner, 1996; Olivares *et al.*, 1996; Azevedo *et al.*, 2005), pero quizás uno de los más importantes y menos estudiados es la flora nativa asociada al cultivo que competirá con las bacterias inoculadas. Por otro lado, se ha estudiado que la composición química del suelo y el tipo de planta influyen en la estructura de la comunidad de bacterias del suelo y en las bacterias endófitas. El cultivo de arroz en Uruguay se realiza en dos regiones distintas del país (norte-centro y este) que comprenden suelos con diferentes características fisicoquímicas. En este trabajo se plantea utilizar suelos diferentes para aislar e identificar bacterias asociadas al cultivo que sean capaces de fijar nitrógeno o solubilizar fosfato, determinar si tienen otras propiedades de promoción del crecimiento y conocer si son capaces de inhibir a BPCV.

Materiales y métodos

Muestreo y propiedades fisicoquímicas del suelo.

Se tomaron muestras de suelos en el otoño de 2011 de dos regiones del Uruguay donde se cultiva arroz: Norte (N) y Este (E). El suelo se secó a temperatura ambiente, se tamizó y posteriormente se utilizó para este ensayo. Se emplearon suelos con diferente contenido de carbono orgánico y uso: suelos de campo natural (CN) utilizados para ganadería y suelos que habían sido utilizados para cultivar arroz en el verano anterior (A). Cada muestra de suelo fue considerada como un tratamiento diferente, obteniendo así un total de 8 tratamientos. La denominación, localización y propiedades del suelo se muestran en la Tabla 1.

El carbono orgánico se determinó por el método de Walkley-Black, el nitrógeno por Kjeldahl, el fósforo por el método de Murphy y Riley y la textura por el método de Bouyoucos.

Se realizaron dos controles con suelos esterilizados para comparar el aporte de nutrientes del suelo respecto al aporte del suelo y los microorganismos asociados al rendimiento del cultivo.

Los suelos fueron tamizados y luego fertilizados con 32 mg N como urea, 96 mg P como Na_2HPO_4 y 16 mg K como KCl por kg de suelo, para que todos los tratamientos tuvieran la misma fertilización basal.

Desinfección superficial de las semillas y germinación

Las semillas de arroz, variedad El Paso 144, se hidrataron en agua destilada estéril durante una hora. Luego se desinfectaron con NaClO 2 % con agitación durante 5 minutos. A continuación se realizaron 4 lavados sucesivos de 3 minutos de duración con 200 mL de agua destilada estéril. Para verificar la efectividad de la desinfección superficial realizada sobre la semilla, se puso en contacto dicha superficie con medio de cultivo R2A (Difco) en placas que se incubaron por 5 días a 30°C. Se incubaron las semillas en condiciones asépticas (es decir sobre gasa húmeda esterilizada dentro de placas de Petri) durante 3 días a 30°C y en oscuridad para su germinación.

Ensayo de crecimiento de las plántulas en condiciones controladas

Las semillas germinadas se transfirieron a macetas conteniendo los diferentes suelos. Se incubaron las macetas durante 20 días en el fitotrón a una temperatura de 25 °C, 80 % de humedad y alternando ciclos de luz y oscuridad, de 16 y 8 horas respectivamente.

Tabla 1. Origen y propiedades fisicoquímicas de los suelos utilizados en el ensayo de crecimiento de plántulas.

Suelo	Zona ^a	Cultivo ^b	C orgánico %	N total %	P ppm	Textura		
						Arena %	Limo %	Arcilla %
1	E	A	3,1	0,21	45	15,4	59,3	25,3
2	E	CN	3,5	0,27	28	17,6	55,9	26,5
3	E	A	1,5	0,11	30	38,3	40,4	21,3
4	E	CN	1,6	0,14	17	36,2	40,7	23,1
5	N	CN	1,3	0,13	15	59,7	27,5	12,8
6	N	A	1,0	0,10	26	63,5	26,5	10,0
7	N	A	2,5	0,22	17	18,1	45,5	36,4
8	N	CN	3,1	0,25	10	16,2	44,5	39,3

^aZona: E (Este), N (Norte).

^bCultivo: A (Arroz), CN (Campo Natural).

El experimento consistió en un diseño completamente al azar con dos réplicas, donde se asignaron los tratamientos mediante un diseño factorial. Los factores considerados fueron el origen y contenido de carbono orgánico del suelo (4 niveles) y el uso del suelo (2 niveles) con respecto al cultivo de arroz. Se analizaron 16 unidades experimentales, donde cada unidad experimental estaba formada por 20 plantas de arroz (submuestras). Se colocaron 2 plántulas por maceta, donde cada maceta contenía 50 g de suelo tamizado y fertilizado. La medida del crecimiento se obtuvo por determinación de la longitud (cm) de la parte aérea de la planta.

Selección de tratamientos a analizar y procesamiento de plantas

A los 20 días de crecimiento se comparó la longitud de la parte aérea de las plantas crecidas en los ocho tratamientos para seleccionar dos de ellos a partir de los cuales aislar bacterias endófitas diazótrofes. Para comparar la respuesta en cada tratamiento se realizó un análisis de varianza (ANAVA) mediante la plataforma RStudio (Racine, 2012) del software R (R Core Team, 2013).

Por otra parte, se utilizaron todos los tratamientos para realizar el aislamiento de bacterias rizosféricas solubilizadoras de fosfato inorgánico.

Enriquecimiento y aislamiento de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno

Se tomaron las plantas, se retiró el suelo por lavado, y se hizo un corte para separar la parte aérea de la raíz. Se desinfectó cada parte por separado de manera similar a las semillas. Se utilizó para cada duplicado 200 mL de solución NaClO 2 % con agitación durante 5 minutos, luego se hicieron 4 lavados sucesivos con 400 mL de agua destilada estéril agitando 3 minutos en cada lavado.

Las réplicas se maceraron en morteros estériles y se realizaron diluciones seriadas en NaCl 0,85% hasta la dilución 1:10⁴. Se sembraron todas las diluciones en medio base RMR sin nitrógeno (Elbeltagy *et al.*, 2001) modificando las fuentes de carbono y la atmósfera de incubación (anaerobiosis y aerobiosis) con el fin de recuperar mayor diversidad de diazótrofes. Para anaerobios se utilizó glucosa como fuente de carbono y atmósfera de N₂. Con el fin de recuperar bacterias esporuladas, las diluciones fueron sometidas a un shock térmico de 80 °C durante 15 min. Para anaerobios también se utilizó ácido málico como fuente alternativa de carbono. Para la recupera-

ción de bacterias diazótrofes aerobias/microaerofílicas se utilizaron dos variantes: a) medio base suplementado con macerado alcohólico de planta de arroz, preparado a partir de 200 g de hoja y 500 mL de etanol 80% según Elbeltagy *et al.*, 2001, o b) medio base con citrato como fuente de carbono.

Se inocularon viales (anaerobios) y tubos de vidrio (aerobios) con 5,5 mL de medio líquido y 11,1 mL de medio semisólido respectivamente, y se incubaron durante 5 días a 30 °C en oscuridad.

Se realizó el ensayo de reducción de acetileno (ARA, "Acetylene Reduction Assay", Tripathi y Klingmueller, 1992) en los tubos y viales sembrados con las diluciones de cada tejido y tratamiento. De los tubos y viales positivos se realizaron aislamientos de bacterias aerobias y anaerobias facultativas en medio R2A, incubado a 30 °C durante 48 horas.

Aislamiento de bacterias rizosféricas solubilizadoras de fosfato inorgánico

Se cortaron las raíces de las plantas y, por agitación suave, se removió la porción más importante del suelo en la vecindad de las raíces. Posteriormente se extrajeron los microorganismos de la rizósfera en suero fisiológico estéril agitando las raíces en shaker a 100 rpm, durante 30 minutos. Se sembraron diluciones de la suspensión obtenida en la superficie del medio de cultivo agar Pikovskaya (Pikovskaya, 1948) con cicloheximida 0,05 gL⁻¹, y se incubó a 28 °C durante 7 días. Se realizó el aislamiento de las colonias que presentaron halo de solubilización de fosfato y morfologías diferentes. Las colonias obtenidas se repicaron cinco veces consecutivas en el mismo medio para verificar la persistencia de la propiedad solubilizadora de fosfato. Luego, se purificaron en R2A.

Extracción de ADN

Se realizó por lisis alcalina a partir de cultivos puros y frescos. Se tomó una colonia, se agregaron 100 µL de NaOH 0,05 M y se incubó durante 15 minutos a 90 °C. Se centrifugó 2 minutos a 18600 g, se descartó el pellet y se utilizó el sobrenadante para la amplificación (Jan *et al.*, 1998). Para aquellas cepas en las que no se pudo amplificar a partir de este sobrenadante, se realizó extracción de ADN utilizando el kit Wizard Genomic DNA Purification. Se centrifugó 1 mL de cultivo fresco durante 15 minutos a 15000 g y se procedió según el fabricante. El producto se resuspendió en 50 µL de agua miliQ.

Amplificación del gen *nifH*

Para la amplificación del gen *nifH* mediante PCR se preparó una mezcla conteniendo: buffer para Taq polimerasa 1x, MgCl₂ 2,5 mM; BSA 0,2 mg.mL⁻¹, dNTPs 0,2 mM cada uno, primers PolF (5'-TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3') y PolR (5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3') (Poly *et al.*, 2001) 0,1 μM cada uno, Taq DNA polimerasa 0,05 u.μL⁻¹ y agua miliQ para completar 20 μL. Se amplificó 1 μL de sobrenadante de lisis alcalina o de solución de ADN.

Para realizar la PCR se utilizó el siguiente programa de temperaturas: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos que comprenden: desnaturalización (94 °C durante 1 minuto), hibridación (57 °C durante 1 minuto) y extensión (72 °C durante 1 minuto); una etapa de extensión final de 72 °C durante 10 minutos y una etapa final de 4 °C durante 15 min.

Amplificación del gen 16S rRNA de los aislamientos

Para la amplificación del gen 16S rRNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se preparó una mix conteniendo: buffer para la Taq polimerasa 1x, MgCl₂ 2,5 mM; BSA 0,5 mg.mL⁻¹, dNTPs 0,2 mM cada uno, primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Lane *et al.*, 1991) y 1492R (5'-GGTTACCTT-GTTACGACTT-3') (Turner *et al.*, 1999) 0,48 μM cada uno, Taq DNA polimerasa 0,04 u.μL⁻¹ y agua miliQ para completar 25 μL. Se amplificó 1 μL de sobrenadante de lisis alcalina o de solución de ADN.

Para realizar la PCR se utilizó un termociclador automático (Applied Biosystems, 2720 Thermal Cycler, Singapur) con el siguiente programa de temperaturas: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos que comprenden: desnaturalización (94 °C durante 1 minuto), hibridación (55 °C durante 1 minuto) y extensión (72 °C durante 3 minutos); y una etapa de extensión final de 72 °C durante 7 minutos.

Screening de diversidad usando el gen 16S rRNA

Se realizaron perfiles de restricción del gen 16S rRNA, ARDRA, modificado de Massol-Deyá *et al.* (1995). Para la reacción de restricción se preparó una mix conteniendo: las enzimas MspI y RsaI (Fermentas) en una concentración de 0,3 U μL⁻¹ y el buffer recomendado por el fabricante con BSA 1x. Para cada reacción se utilizaron

2,4 μL de la mix y 12,6 μL del producto PCR del gen 16S rRNA. La digestión se realizó por 12 h a 37°C. Los productos de restricción se separaron en gel de agarosa Methaphor 3,5 % en buffer TBE 0,5x a 100 V durante 1 hora aproximadamente. Como patrón de peso molecular se utilizó el marcador molecular pBR322/HaeIII (Bioron).

Secuenciación parcial del gen 16S rRNA

El gen 16S rRNA se secuenció parcialmente con el primer 27F en el Servicio de secuenciación de MacroGen Inc. usando un secuenciador capilar ABI PRISM 3730XL. La identificación filogenética de las cepas se realizó comparando la secuencia obtenida con la base de datos del servidor EzTaxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>; Kim *et al.*, 2012).

Las secuencias obtenidas fueron depositadas en la base de datos European Nucleotide Archive y sus números de acceso son desde HG799067 al HG799085.

Ensayo ARA

Se evaluó la capacidad de fijar nitrógeno mediante el ensayo de reducción de acetileno en medio RMR sembrado con las diluciones del macerado de parte aérea y raíz. Luego de la incubación se inyectó la cantidad necesaria de acetileno (AGA, 99,95 % de pureza) para obtener una concentración final de 10 % v/v en el "headspace". Se incubó nuevamente a 30 °C y se evaluó la producción de etileno a las 72 horas mediante cromatografía gaseosa, en cromatógrafo SRI 8610 equipado con detector de ionización de llama y una columna Porapak R (80/100 mesh, 6 feet x 1/8 inch), utilizando N₂ como gas carrier y 45 °C de temperatura de horno. Los cromatogramas se analizaron con el software Peaksimple2. Como control positivo se usó *Azospirillum brasilense*, cepa Az39. Se tomaron como positivos los tubos que daban áreas de etileno 100 veces mayores que el nivel basal de controles con acetileno, no inoculados.

La evaluación de la capacidad fijadora de nitrógeno de las cepas aisladas se realizó de tal forma que cada cepa fue inoculada en la misma variante del medio sin nitrógeno RMR (descriptas anteriormente) del cual fue aislada originalmente. Todas las cepas se sembraron en RMR en condiciones aerobias y se incubaron por 3 días. El resto del procedimiento fue igual al descrito anteriormente.

Solubilización de fosfato inorgánico

La capacidad solubilizadora de fosfato de los aislamientos se evaluó en el medio agar Pikovskaya (Pikovskaya, 1948) con cicloheximida $0,05 \text{ g L}^{-1}$, con incubación a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 7 días. Como resultado positivo se consideró la observación de un halo de solubilización alrededor de las colonias aisladas que persiste durante cinco subcultivos en el mismo medio.

Producción de sideróforos

Se evaluó la capacidad de producir sideróforos en medio de cultivo sólido R2A-CAS (modificado de Schwyn *et al.*, 1987). Se realizaron aislamientos por estriación en placa y se incubaron por 48 horas a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Luego se verificó la producción de sideróforos por la presencia de un halo amarillo alrededor de la colonia.

Producción y cuantificación de ácido indolacético

Las cepas se hicieron crecer en tubos con 5 mL de medio King B conteniendo 20 g L^{-1} de peptona de origen animal, $1,15 \text{ g L}^{-1}$ de K_2HPO_4 , $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y se suplementó con $2,5 \text{ mM}$ de triptófano. Se incubó a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ en oscuridad, durante 12 horas. Luego se midió la densidad óptica (DO) de cada cultivo bacteriano a 600 nm . Se centrifugaron las células y sobre el sobrenadante se cuantificó el ácido indolacético (AIA). A 1 mL de sobrenadante se agregó 1 mL de reactivo colorimétrico: FeCl_3 , 12 g L^{-1} y H_2SO_4 , $7,9 \text{ M}$ (Glikmann y Dessaux, 1994). Se incubó durante 30 minutos en la oscuridad y se midió la absorbancia a 530 nm . Se corrigió la producción de indoles por la medida de DO para cada cepa. Se realizó una curva con estándar de AIA (Sigma). Se expresó el resultado como la cantidad de AIA producido por unidad de volumen y de DO ($\text{mg de AIA mL}^{-1} \text{ DO}^{-1}$). Los ensayos se realizaron por duplicado.

Ensayo de competencia entre aislamientos y posibles BPCV

Se utilizó el medio NFBI (Loaces *et al.*, 2011) que permite el crecimiento simultáneo de diversas bacterias asociadas al cultivo de arroz y BPCV. El ensayo de competencia se realizó como allí se describe y brevemente se detalla aquí. Para la inoculación se emplearon cultivos en fase exponencial de crecimiento (12 -14 horas de incubación a 30°C y 100 rpm) en medio NFBI líquido.

Para las BPCV se realizaron diluciones de la suspensión para sembrar 10^5 células mL^{-1} de medio NFBI agar. Después de la solidificación del agar, en cada placa se realizó una estría con $10 \mu\text{L}$ de una suspensión de la cepa posible antagonista con 10^5 células mL^{-1} , y se incubó por 48 horas a 30°C . Los ensayos se hicieron por duplicado. Un halo de inhibición del crecimiento de las BPCV (incorporadas en el agar) alrededor de la estría indica que esta cepa es antagonista de la cepa PCV.

Para el ensayo de competencia se utilizaron como referencia de *A. brasilense* las cepas Az39, Sp7 y Sp245; y como referencia la cepa Z67 de *H. seropedicae*.

Resultados y discusión

Crecimiento de las plántulas en diferentes suelos

A los veinte días de crecimiento controlado en fitotrón, antes de que las plantas fueran extraídas de la maceta para ser procesadas, se midió el largo de la parte aérea de cada una. Los datos fueron analizados estadísticamente y los resultados mostraron que no se obtuvieron diferencias significativas para el largo de parte aérea entre los ocho tratamientos, y tampoco con los dos controles que se sembraron con suelo esterilizado, obteniéndose un largo medio de $28,0 \pm 3,0 \text{ cm}$. Por lo tanto, para realizar los aislamientos de bacterias endófitas diazótrofes se seleccionaron dos tratamientos que presentaron características contrastantes en cuanto a color y ancho de tallos y hojas. Las plantas del suelo 2 (Tabla 1) estaban más vigorosas mientras que las del suelo 8 se observaron con menor ancho de hoja y tallo y además con falta de pigmentación. También se aislaron bacterias diazótrofes endófitas de plantas crecidas en suelo 1, luego de 90 días de siembras y 30 días de inundación.

Aislamiento e identificación de bacterias endófitas diazótrofes

Los enriquecimientos aerobios para los cuales el ensayo ARA dio positivo (ARA^+) se subcultivaron 3 veces en el mismo medio para verificar que la capacidad fijadora de nitrógeno del cultivo se mantenía. De ellos se aislaron 80 cepas, de las cuales solamente 20 (25%) dieron amplificación positiva para el gen *nifH* (*nifH*⁺). Las cepas *nifH*⁺ aisladas fueron sembradas en medio de cultivo RMR semisólido con las mismas características del cual fue aislada originalmente y se observó que no todas las cepas eran capaces de reducir acetileno.

En el screening de diversidad realizado por ARDRA para las 20 cepas *nifH*⁺ se observaron 14 perfiles distintos, indicando que habría diversidad a nivel del gen 16S rRNA entre los aislamientos. Por lo tanto, a la hora de identificar las cepas, se secuenció el gen 16S rRNA de las 20. El resultado de la secuenciación mostró haber más redundancia de especies que las determinadas por

ARDRA. A partir de esta información se trabajó con una selección de 10 cepas que pertenecen a 4 géneros, que tienen el gen *nifH* y la capacidad de reducir el acetileno (Tablas 2 y 3).

Si bien en los tubos iniciales no se obtuvieron enriquecimientos anaerobios de microorganismos reductores de acetileno, en algunos de ellos se logró amplificar el gen *nifH*. A partir de estos

Tabla 2. Origen e Identificación de los aislamientos asociados al cultivo de arroz

Cepa	Especie más cercana (Nº acceso)	% Similitud	Origen ^a
5	<i>Azospirillum largimobile</i> (X90759)	99,0	8 ER
10	<i>Azospirillum largimobile</i> (X90759)	99,4	2 EPA
45	<i>Azospirillum largimobile</i> (X90759)	99,2	2 ER
64	<i>Azospirillum largimobile</i> (X90759)	99,4	8 ER
20	<i>Azospirillum oryzae</i> (AB185396)	99,0	8 ER
16, 75	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> (Y10146)	99,6	2 EPA
52	<i>Enterobacter sacchari</i> (JQ001784)	96,3	8 ER
69, 70	<i>Enterobacter sacchari</i> (JQ001784)	99,5	8 ER
H	<i>Paenibacillus graminis</i> (AJ223987)	99,6	8 ER
G	<i>Paenibacillus graminis</i> (AJ223987)	99,6	8 EPA
B2	<i>Pleomorphomonas oryzae</i> (AB159680)	99,9	1 ER
C	<i>Pleomorphomonas oryzae</i> (AB159680)	99,5	1 EPA
T3A	<i>Burkholderia ubonensis</i> (EU024179)	95,9	3 RZ
T3C	<i>Burkholderia cepacia</i> (U96927)	93,2	3 RZ
T3G	<i>Burkholderia cepacia</i> (U96927)	96,2	3 RZ
T7B	<i>Burkholderia cepacia</i> (U96927)	95,4	7 RZ
T7C	<i>Burkholderia ubonensis</i> (EU024179)	97,4	7 RZ

^aOrigen: suelo y asociación con la planta (Endófitas raíz: ER; endófitas de parte aérea: EPA; rizósfera: RZ)

Tabla 3. Propiedades promotoras de crecimiento vegetal de las cepas aisladas.

Cepa	Propiedades			
	Producción de sideróforos ^a	Solubilización de fosfatos ^a	ARA	Producción de AIA ^b
5	+	-	+	17,0 ± 10,3
10	+	-	+	11,4 ± 1,0
45	+	-	+	11,9 ± 0,8
64	+	-	+	9,6 ± 0,1
20	+	-	+	20,4 ± 7,9
16	+	-	+	17,5 ± 3,1
75	+	-	+	15,3 ± 2,8
52	+	-	+	3,9 ± 0,3
69	+	-	+	5,2 ± 0,6
70	+	-	+	5,6 ± 0,0
H	Nd	Nd	+	8,3 ± 1,8
G	Nd	Nd	+	7,0 ± 1,5
B2	Nd	Nd	+	53,8 ± 9,4
C	Nd	Nd	+	49,3 ± 27,7
T3A	+	+	+	5,1 ± 1,3
T3C	+	+	+	6,1 ± 0,5
T3G	+	+	+	5,2 ± 0,2
T7B	+	+	+	4,1 ± 1,3
T7C	+	+	+	4,6 ± 0,1

^aNd= No determinado debido a que la cepa no creció en el medio de cultivo de ese ensayo.

^bLa producción de AIA se expresa en µg AIA mL⁻¹ de cultivo por unidad de densidad óptica (DO) medida a 600nm. Media ± error estándar.

tubos *nifH*⁺ se realizaron aislamientos en medio sólido R2A en condiciones aerobias y se verificó la presencia del gen *nifH* en las cepas purificadas. Como resultado se obtuvieron un total de 4 cepas anaerobias facultativas que poseen el gen *nifH*, 2 aisladas de medio de cultivo con glucosa y 2 con ácido málico. La secuenciación de los genes 16S rRNA reveló que las especies endófitas diazótropas presentes son *Azospirillum largimobile*, *Azospirillum oryzae*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Enterobacter cloacae*, *Paenibacillus graminis* y, después de la inundación, *Pleomorphomonas oryzae* (Tabla 2). Excepto por la cepa 52, los aislamientos pudieron identificarse a nivel de especie ya que las secuencias analizadas mostraron más de 99% de similitud con secuencias conocidas depositadas en el banco de datos. Estos resultados sugieren que *A. largimobile* está presente en suelos de praderas naturales del Norte y del Este y coloniza tempranamente los tejidos de *O. sativa*, preferencialmente las raíces (Tabla 2). Por el contrario, *H. seropedicae* sólo se aisló de la parte aérea de plantas crecidas en suelo del Este, mientras que *E. cloacae* y *P. graminis* colonizan preferencialmente raíces de plantas sembradas en suelos del Norte.

Pleomorphomonas oryzae pudo recuperarse sólo como endófito de raíz y parte aérea de plantas en etapa reproductiva, 30 días después de la inundación, en un suelo que había sido utilizado previamente para el cultivo de arroz. Esta especie se ha detectado sólo por métodos moleculares como endófito de arroz en trabajos previos (Ferrando *et al.*, 2012). En cambio, las bacterias del género *Azospirillum* y, en menor medida, de la especie *Herbaspirillum seropedicae*, son ampliamente reconocidas como promotoras de crecimiento asociadas a gramíneas. Se han utilizado en inoculantes comerciales en Argentina y Uruguay (Iglesias *et al.*, 2008; Martino, 2008; Hoffman *et al.*, 2008; Punschke y Mayans, 2011), y han sido recomendadas para la promoción del crecimiento por los resultados obtenidos por numerosos ensayos de campo en Argentina y Brasil para varios cultivos (Pedraza *et al.*, 2009; García de Salamone *et al.*, 2012; Teixeira *et al.*, 2008).

Aunque *A. brasilense* es la especie más reconocida para la promoción del crecimiento vegetal, se ha observado que muchas características de importancia agronómica dependen de la cepa más que de la especie (Cassán *et al.*, 2008).

Aislamiento e identificación de bacterias rizosféricas solubilizadoras de fosfato

Sólo se aislaron cinco cepas capaces de solubi-

lizar fosfato. Estos aislamientos se obtuvieron de la rizósfera de las plantas crecidas en los suelos 3 (T3) y 7 (T7). La característica común a estos suelos es que habían sido cultivados con arroz en el verano anterior. Todos los aislamientos pertenecen al género *Burkholderia* (Tabla 2), aunque la identificación a nivel de especie es relativamente incierta debido a que en la mayoría de los casos el porcentaje de similitud con secuencias de la base de datos es baja, particularmente dentro del cluster *B. cepacia*.

Las bacterias asociadas a diferentes gramíneas pertenecientes al género *Burkholderia* han sido aisladas por sus propiedades solubilizadoras de fosfato o por su capacidad de fijar nitrógeno. Recientemente se ha reportado que diferentes especies de este género pueden promover el crecimiento del cultivo de arroz (Singh *et al.*, 2011; de Souza *et al.*, 2013) o aún el rendimiento en grano (Govindarajan *et al.*, 2007; Estrada *et al.*, 2013). La tolerancia a bajos pH y la capacidad de utilizar citrato y oxalato explicarían su ubicuidad y dominancia en sistemas que requieren alta solubilización de fosfato (Weisskopf *et al.*, 2011).

Caracterización de cepas

En la Tabla 3, se puede apreciar que las especies que mostraron mayor capacidad fijadora de nitrógeno mediante ARA son *A. largimobile* y *H. seropedicae*, para los cuales se obtuvieron máximos de 2,90 y 2,30 nmoles de etileno consumidos por hora.

Se ha observado por métodos de hibridación *in situ* (Monteiro *et al.*, 2008) y mediante el uso del gen reportero *gusA* asociado al *nifH* (Roncato-Maccari *et al.*, 2003a) que *H. seropedicae* coloniza tejidos internos tanto en la raíz como en parte aérea de gramíneas y que la inoculación con esta especie produce un aumento en la biomasa total del cultivo de arroz y caña de azúcar (Boddey *et al.*, 1995; Baldani *et al.*, 2000; James *et al.*, 2002; Gyaneshwar *et al.*, 2002). Se propone que *H. seropedicae* promovería el crecimiento de estas gramíneas mediante la fijación biológica de nitrógeno, la producción de fitohormonas, de ACC (1-aminocyclopropane 1-carboxylate) deaminasa y de sideróforos (Pedrosa *et al.*, 2011; Roncato-Maccari *et al.*, 2003b; Bastián *et al.*, 1998).

Al igual que en el presente trabajo, otros autores han reportado que *A. oryzae*, especie que se encuentra asociada a la raíz de *Oryza sativa*, es fijadora de nitrógeno porque posee gen *nifH* y tiene la capacidad de reducir acetileno (Xie y Yokota, 2005). Si bien no se han reportados datos sobre la producción de ácido indolacético (AIA),

nuestro ensayo muestra que *A. oryzae* 20 alcanza valores más altos al promedio obtenido para *A. largimobile*.

En cuanto a las cepas *Burkholderia*, se observó que poseen todas las propiedades PCV ensayadas. Si bien no mostraron ser grandes productoras de AIA, fueron las únicas capaces de solubilizar fosfato inorgánico para las condiciones establecidas.

Resulta interesante observar que las bacterias que producen mayor cantidad de AIA se obtuvieron de plantas bajo inundación y son de la especie *Pleomorphomonas oryzae*.

Ensayo de competencia entre cepas antagonistas y posibles PCV

En la Tabla 4 se observa que existe un antagonismo prominente por parte de las cepas *Burkholderia* frente a las cepas referencia de *A. brasilense*. De manera opuesta, se vio que *A. largimobile* 45 y *A. oryzae* 20 no fueron inhibidos por las cepas *Burkholderia*, salvo T7C que sí mostró ser antagonista de *A. oryzae* 20. Para el caso de las cepas *Herbaspirillum seropedicae* se vio que ambas fueron inhibidas por *Burkholderia*. En cuanto a *P. graminis* G, se observó que solamente es inhibida por las cepas T3C y T3G. Estas cepas, que podrían pertenecer a la especie *B. cepacia*, provienen del mismo suelo y además de la misma zona que *P. graminis* G, pero con diferente uso del suelo.

Entre las cualidades promotoras del crecimiento de las bacterias del género *Burkholderia* también está la actividad antifúngica reconocida contra patógenos de maíz (Zhao *et al.*, 2014) y de arroz (Loaces *et al.*, 2011). Si bien la actividad antibacteriana de muchas de las especies de este género se conoce desde 1998 (Hu and Young, 1998), raramente se ha considerado que esta

podría ser una desventaja en la co-inoculación con otras BPCV (Loaces *et al.*, 2011). Aparentemente, la actividad antifúngica de estas bacterias estaría relacionada con la producción de compuestos volátiles como alfa-pineno y limoneno. (Tenorio Salgado *et al.*, 2013), aunque estos autores también observaron una gran capacidad para producir sideróforos en estas bacterias. Ambos mecanismos no son específicos y también podrían inhibir el crecimiento de bacterias.

Conclusiones

En este trabajo se constata que ciertas cepas de *H. seropedicae* y del género *Azospirillum*, con propiedades promotoras del crecimiento en gramíneas, son endófitas de arroz cultivado en suelos uruguayos que no han sido utilizados para la producción de arroz. Cepas del género *Burkholderia* mostraron ser, *in vitro*, antagonistas de bacterias con propiedades PCV aisladas en este trabajo y frente a las cepas Az39, Sp245 y Sp7 de *Azospirillum brasilense*. La diferencia en la diversidad bacteriana recuperada no se refleja en diferencias en el desarrollo de la parte aérea de la planta a los 20 días de su crecimiento. Estos resultados indican que el Uruguay posee suelos con un potencial biológico que no ha sido explotado aún, y que además, es necesario profundizar en estudios sobre la flora nativa asociada a los cultivos.

Agradecimientos

G.R. y A.M. recibieron becas ANII de Iniciación a la Investigación. Otras agencias financiadoras son CSIC (Comisión Sectorial de Investigación Científica de la UdelaR) y PEDECIBA (Programa de Desarrollo de la Ciencias Básicas). Agradecemos especialmente a los Ing. Agr. Clau-

Tabla 4. Inhibición del crecimiento de bacterias con propiedades de promoción de crecimiento vegetal por cepas rizosféricas solubilizadoras de fosfato aisladas en este trabajo.

Cepa rizosférica	Cepas con propiedades promotoras de crecimiento vegetal ^{a, b, c}							
	<i>A.b.</i> Sp245	<i>A.b.</i> Sp7	<i>A.b.</i> Az39	<i>A.o.</i> 20 ^b	<i>A.l.</i> 45 ^b	<i>H.s.</i> Z67	<i>H.s.</i> 16 ^b	<i>P.g.</i> G ^b
T3A ^b	+	+	+	-	-	+	+	-
T3C ^b	+	+	+	-	-	+	+	+
T3G ^b	+	+	+	Nd	Nd	+	Nd	+
T7B ^b	+	+	+	-	-	+	+	-
T7C ^b	+	+	+	+	-	+	+	-

^a Cepas: *A.b.* : *Azospirillum brasilense*, *A.o.*: *Azospirillum oryzae*; *A.l.*: *Azospirillum largimobile*; *H.s.*: *Herbaspirillum seropedicae*; *P.g.*: *Paenibacillus graminis*.

^b Cepas aisladas en este estudio.

^c El signo + indica inhibición del crecimiento de la BPCV por la cepas rizosféricas solubilizadoras de fosfato (T). El signo - indica que no hay antagonismo entre las dos cepas. Nd: indica no determinado.

dia Marchesi (INIA Tacuarembó) y Álvaro Roel y Guillermina Cantou (INIA Treinta y Tres) por facilitarnos los suelos y las semillas.

Bibliografía

- ACA. (2010). Cuatro años de inoculación de arroz. Revista de la Asociación de Cultivadores de Arroz 63: 38-42.
- Azevedo M.S., Teixeira K.R.S., Kirchoff G., Hartmann A., Baldani J.I. (2005). Influence of soil and host plant crop on the genetic diversity of *Azospirillum amazonense* isolates. Pedobiología 49: 565-576.
- Babana A.H. and Antoun H. (2007). Effect of Tilemsi phosphate rock-solubilizing microorganisms on phosphorus uptake and yield of field-grown wheat (*Triticum aestivum* L.) in Mali. En: First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Velázquez, E. and Rodríguez-Barrueco, C. (Eds.). Springer. pp. 51-58.
- Baldani V.L.D., Baldani J.I., Döbereiner J. (2000). Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* sp. Biology and Fertility of Soils 30: 485-491.
- Bastián F., Cohen A., Piccoli P., Luna V., Baraldi R., Bottini R. (1998). Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. Plant Growth Regulation 24: 7-11.
- Boddey R.M., de Oliveira O.C., Urquiaga S., Reis V.M., Olivares F.L., Baldani V.L.D., Döbereiner J. (1995). Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. Plant and Soil 174: 195-209.
- Cassán F., Sgroi V., Perrig D., Masciarelli O., Luna V. (2008). Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp. Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. En: *Azospirillum* sp.: Cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Cassán, F.F. and García de Salamone, I. (Eds.). Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina. pp. 61-86.
- Chincholkar S.B., Chaudhari B.L., Rane M.R. (2007). Microbial siderophores in human and plant health-care. En: Microbial Siderophores. Varma, A. and Chincholkar, S. (Eds.). Springer. pp. 205-217.
- Chuang C., Kuo Y.L., Chao C. and Chao W. (2007). Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. Biology and Fertility of Soils 43: 575-584.
- de Souza R., Beneduzi A., Ambrosini A., da Costa P.B., Meyer J., Vargas L.K., Schoenfeld R., Passaglia L.M.P. (2013). The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. Plant and Soil 366: 585-603.
- Elbeltagy A., Nishioka K., Sato T., Suzuki H., Ye B., Hamada T., Isawa T., Mitsui H. and Minamisawa K. (2001). Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. Applied and Environmental Microbiology 67: 5285-5293.
- Estrada G.A., Baldani V.L.D., de Oliveira D.M., Urquiaga S., Baldani J.I. (2013). Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. Plant and Soil 369: 115-129.
- FAO. (2004). Año internacional del arroz. <http://www.fao.org/rice2004/>. Consulta: mayo 2012.
- Faraldo G.J. (2007). Protein-mediated siderophore uptake in gram-negative bacteria: a structural perspective. En: Microbial Siderophores. Varma, A. and Chincholkar, S. (Eds.). Springer. pp. 105-120.
- Ferrando L., Mañay F.J., Scavino F.A. (2012). Molecular and culture-dependent analyses revealed similarities in the endophytic bacterial community composition of leaves from three rice (*Oryza sativa*) varieties. FEMS Microbiology Ecology 80: 696-708.
- García de Salamone I.E. and Döbereiner J. (1996). Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. Biology and Fertility of Soils 21: 193-196.
- García de Salamone I.E., Funes J.M., Di Salvo L.P., Escobar Ortega J.S., D'Auria F., Ferrando, L. and Fernández Scavino A. (2012). Inoculation of paddy rice with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact of plant genotypes on the rhizosphere microbial communities and field crop production. Applied Soil Ecology 61: 196-204.
- Glickmann E., Dessaux Y. (1994). A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. Applied and Environmental Microbiology 61: 793-796.
- Govindarajan M., Balandreau J., Kwon S., Weon H.Y., Lakshminarasimhan C. (2007). Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamsis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield rice. Microbial Ecology 55: 21-37.
- Gyaneshwar P., James E.K., Reddy P.M., Ladha J.K. (2002). *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. New Phytologist 154: 131-145.
- Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahafee W.F., Kloepper J.W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology 43: 895-914.
- Harrington J.M., Crumbliss A.L. (2009). The redox hypothesis in siderophore-mediated iron uptake. Biometals 22: 679-689.
- Hartmann A., Baldani J.I. (2006). The Genus *Azospirillum*. En: The Prokaryotes. Tercera edición. Dworkin, M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. (Eds.). Springer, New York. pp. 115-140.
- Hoffman E., Mazzilli S., Mesa P. (2008). Utilización de inoculantes a base de *Azospirillum brasilense* en especies agrícolas de interés en Uruguay. La experiencia con el maíz. En: *Azospirillum* sp.: Cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Cassán, F.F. and García de Salamone, I. (Eds.). Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina. pp. 251-260.

- Hu F.P. and Young J.M. (1998). Biocidal activity in plant pathogenic *Acidovorax*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Ralstonia* and *Xanthomonas* spp. *Journal of Applied Microbiology* 84: 263–271.
- Iglesias M.C., Leconte M.C., Sotelo C.E., Cossoli M.R. (2008). Utilización de inoculantes con *Azospirillum brasilense* en cultivos de interés regional en el nordeste argentino. En: *Azospirillum* sp.: Cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Cassán, F.F. and García de Salamone, I. (Eds.). Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina. pp. 189- 207.
- James E.K., Gyaneshwar P., Mathan N. (2002). Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 894–906.
- Kim O.S., Cho Y.J., Lee K., Yoon S.H., Kim M., Na H., Park S.C., Jeon Y.S., Lee J.H., Yi H., Won S., Chun J. (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 716–721.
- Lane D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. En: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (Eds.). John Wiley and Sons, New York, NY. pp. 115-175.
- Li C.H., Zhao M.W., Tang C.M., Li S.P. (2009). Population Dynamics and Identification of Endophytic Bacteria Antagonistic Toward Plant-Pathogenic Fungi in Cotton Root. *Microbial Ecology* 59: 344-56.
- Loaces I., Ferrando L., Scavino A.F. (2011). Dynamics, Diversity and Function of Endophytic Siderophore-Producing Bacteria in Rice. *Microbial Ecology* 61: 606-618.
- Martino, M.M. (2008). Evaluación del efecto de inoculación con Bioprom Az39 y *Rhanelia* sp. EMA-83 en Maíz. Validación y Desarrollo de Tecnologías. http://www.calister.com.uy/wp-content/files_mf/1311185800Inoculante_Bioprom_Maiz.pdf, consulta: octubre 2013.
- Monteiro R.A., Schmidt M.A., Baura V.A., Balsanelli E., Wassem R., *et al.* (2008). Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. Poales, Poaceae) roots by *Herbaspirillum seropedicae* (Burkholderiales, Oxalobacteraceae). *Genetics and Molecular Biology* 31: 932–937.
- O’Sullivan D.J., O’Gara F. (1992). Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 56: 662-676.
- Olivares F.L., Baldani V.L.D., Reis V.M., Baldani J.I., Döbereiner J. (1996). Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves, predominantly of Gramineae. *Biology and Fertility of Soils* 21: 197–200.
- Pedraza R.O., Motok J., Salazar S.M., Ragout A.L., Mentel M.I., Tortora M.L., Guerrero-Molina M.F., Winik B.C. and Díaz-Ricci J.C. (2009). Growth-promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26: 265-272
- Pedrosa F.O., Monteiro R.A., Wassem R., Cruz L.M., Ayub R.A., *et al.* (2011). Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses. *PLoS Genetics* 7(5): e1002064. doi:10.1371/journal.pgen.1002064.
- Pikosvkaya R.I. (1948). Mobilization of phosphates in soil in relation with vital activity of some microbial species (In Russian). *Mikrobiologiya* 17: 362-320.
- Punschke K. y Mayans M. (2011). Selección de cepas de *Herbaspirillum* spp. promotoras del crecimiento de arroz. *Agrociencias Uruguay*. 15: 19-26.
- R Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Racine J.S. (2012). RStudio: A Platform-Independent IDE for R and Sweave. *Journal of Applied Econometrics* 27: 167-172.
- Renhold-Hurek B., Hurek T. (1998). Interactions of graminaceous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization, and perspectives to study their function. *Critical Reviews in Plant Sciences* 17: 29-54.
- Rives N. (2006). Caracterización de géneros bacterianos rizoféricos y endófitos en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) [Tesis de Maestría]. Facultad de Biología. Universidad de la Habana.
- Roncato-Maccari L.D.B., Ramos H.J.O., Pedrosa F.O., Alquini Y., Chubatsu L.S., Yates M.G., Rigo L.U., Steffens M.B.R, Souza E.M. (2003b). Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. *FEMS Microbiol Ecology* 45: 39–47.
- Roncato-Maccari L.D.B., Ramos H.J.O., Pedrosa F.O., Alquini Y., Chubatsu L.S., Yates M.G., Rigo L.U., Steffens M.B.R, Souza E.M. (2003a). Root colonization, systemic spreading and contribution of *Herbaspirillum seropedicae* to growth of rice seedlings. *Symbiosis* 35: 01–10.
- Schwyn B., Neilands J. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160: 47-56.
- Singh M.K., Singh D.P., Mesapogu S., Babu B.K., Bontemps C. (2011). Concomitant colonization of *nifH* positive endophytic *Burkholderia* sp. in rice (*Oryza sativa* L.) promotes plant growth. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 2023-2031
- Teixeira K.R.S., Reis V.M., Baldani V.L.D., Baldani J.I. The genetic diversity of *Azospirillum amazonense* and its agrobiotechnological potential. En: *Azospirillum* sp.: Cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Cassán, F.F. and García de Salamone, I. (Eds.). Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina. pp. 131- 142.
- Tenorio-Salgado S., Tinoco R., Vazquez-Duhalt R., Caballero-Mellado J., Perez-Rueda, E. (2013). Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. *Bioengineered*. 4: 236-243
- Tripathi A.K., Klingmueller W. (1992). Temperature sensitivity of nitrogen fixation in *Azospirillum* spp.

- Canadian Journal of Microbiology 38: 1238-1241.
- Tsavkelova E.A., Klimova S.Y., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I. (2006). Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. Applied Biochemistry and Microbiology 42: 117-126.
- Turner S., Pryer K.M., Miao V.P.W. and Palmer J.D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. Journal of Eukaryotic Microbiology 46: 327-338.
- Valverde A., Burgos A., Fiscella T., Rivas R., Velázquez E., Rodríguez-Barrueco C., Cervantes E., Chamber M. and Igual J.M. (2007). Differential effects of coinoculations with *Pseudomonas jessenii* PS06 (a phosphate-solubilizing bacterium) and *Mesorhizobium ciceri* C-2/2 strains on the growth and seed yield of chickpea under greenhouse and field conditions. En: First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Velázquez, E. and Rodríguez-Barrueco, C. (Eds). Springer. pp. 43-50.
- Van der Lelie D., Taghavi S., Monchy S., Schwender J., Miller L., Ferrieri R., Rogers A., Zhu W., Weyens N., Vangronsveld J., Newman L. (2009). Poplar and its Bacterial Endophytes: Coexistence and Harmony. Critical Reviews in Plant Sciences 28: 346-358.
- Vassilev N., Medina A., Azcon R. and Vassileva M. (2007). Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake. En: First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Velázquez, E. and Rodríguez-Barrueco, C. (Eds). Springer. pp. 77-84.
- Wasule D.L., Wadyalkar S.R. and Buldeo A.N. (2007). Effect of phosphate solubilizing bacteria on role of Rhizobium on nodulation by soybean. En: First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Velázquez, E. and Rodríguez-Barrueco, C. (Eds). Springer. pp. 139-142.
- Weisskopf L., Heller S., and Eberl L. (2011). *Burkholderia* Species are major inhabitants of white lupin cluster roots. Applied and Environmental Microbiology. 77:7715-20.
- Widada J., Damarjaya D.I. and Kabirun S. (2007). The interactive effects of arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobacteria on the growth and nutrients uptake of sorghum in acid soil. En: First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Velázquez, E. and Rodríguez-Barrueco, C. (Eds). Springer. pp. 173-177.
- Xie C.H., Yokota A. (2005). *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55:1435-1438.
- Zhao K., Penttinen P., Zhang X., Ao X., Liu M., Yu X., Chen Q. (2014). Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities. Microbiological Research 169: 76-82.