

Artículo científico

Caracterización de rizobacterias nativas y su efecto en la promoción de crecimiento de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en condiciones controladas**Characterization of native rhizobacteria and their effect on chickpea growth promotion (*Cicer arietinum* L.) under controlled conditions**

M.L. Aldonate; P. Jiménez; E.L. Ulla*

Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán. Avda. Kirchner 1900, (4000), Tucumán, Argentina.
*E-mail: elsaula59@gmail.com

Resumen

En Tucumán el cultivo de garbanzo está en expansión con excelentes perspectivas de comercialización. Las evidencias demuestran el efecto estimulante para la planta de la inoculación bacteriana, y se destaca la conveniencia de la adopción de esta tecnología para el sostenimiento de altos rendimientos de este cultivo en la región. Las bacterias nativas constituyen una excelente fuente para la selección de nuevas cepas con capacidad para promover el crecimiento vegetal. Los objetivos fueron caracterizar rizobacterias nativas y evaluar su desempeño como promotoras del crecimiento vegetal en garbanzo en condiciones controladas. Se trabajó con seis bacterias que demostraron, *in vitro*, capacidad para solubilizar fosfatos, fijar nitrógeno atmosférico, producir sideróforos y actuar como agentes de biocontrol. Semillas de garbanzo desinfectadas y pregerminadas se inocularon por inmersión en las suspensiones bacterianas, se sembraron en macetas con vermiculita esterilizada y se colocaron en cámara de cría a 22 ± 2 °C, humedad 25 % y fotoperiodo 16/8 horas. A los 45 días, se analizaron: altura de planta, porcentaje de fósforo foliar, peso seco de parte aérea y de raíces y longitud de raíces. Los resultados mostraron que los aislamientos Ba, Pf, YM₁, Ym₃, YM₄ y Me, solubilizan fosfato tricálcico y producen sideróforos. Ba, Pf, YM₁, YM₃, Ym₄, presentan actividad nitrogenasa, y Ba, Me y YM₄ producen inhibición de micelio fúngico. Como consecuencia de la inoculación con estos aislamientos, se incrementaron altura de planta, contenido de fósforo foliar y peso seco de parte aérea y raíces, desempeño que los hace promisorios para su uso como potencial bioinsumo en garbanzo.

Palabras clave: Rizobacteria; Bioinsumo; Garbanzo.

Abstract

In Tucumán, chickpea cultivation is expanding with excellent marketing prospects. The evidence demonstrates the stimulating effect for the bacterial inoculation plant, and the convenience of adopting this technology for sustaining high yields of this crop in the region. Native bacteria are an excellent source for the selection of new strains with the capacity to promote plant growth. The objectives were to characterize native rhizobacteria and evaluate their performance as plant growth promoters in chickpea under controlled conditions. The work was done with six bacteria that demonstrated, *in vitro*, ability to solubilize phosphates, fix atmospheric nitrogen, produce siderophores and act as biocontrol agents. Disinfected and pregerminated chickpea seeds were inoculated by immersion in bacterial suspensions, planted in pots with sterilized vermiculite and placed in a breeding chamber with 22 ± 2 °C, RH 25% and photoperiod 16/8 h. After 45 days, plant height; percentage of foliar phosphorus; dry weight of the aerial part and of roots and length of roots were analyzed. The results showed that the isolated Ba, Pf, YM₁, YM₃, YM₄ and Me, solubilize tricalcium phosphate and produce siderophores. Ba, Pf, YM₁, YM₃, YM₄, have nitrogenase activity, and Ba, Me and YM₄ produce inhibition of fungal mycelium. As a consequence of the inoculation with these isolates, under controlled conditions, plant length, foliar phosphorus content and dry weight of aerial part and roots were increased, performance that makes them promising for use as a potential bio-product in chickpea.

Keywords: Rizobacteria; Bio-product; Chickpea.

Introducción

Las legumbres son consideradas como una de las principales fuentes de proteína vegetal para la

alimentación humana. El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) constituye una gran riqueza en lo que a aportes nutritivos se refiere. Su valor está dado por el nivel de proteínas, almidones y lípidos (más que

Recibido: 03/11/2019; Aceptado 25/11/2019.

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

otras legumbres) y al mismo tiempo, aporta fibra y calorías. Es la segunda leguminosa más cultivada en muchas partes del mundo y el 96 % se produce en los países en desarrollo (FAOSTAT, 2010).

En Argentina, el cultivo del garbanzo representa una alternativa válida, no sólo para las zonas de regadío, sino también para las otras regiones del país, como el noroeste argentino (NOA), que poseen las mejores condiciones agroecológicas para la producción de esta legumbre invernal (Vizgarra, 2017).

La incorporación de nuevas zonas productoras y el crecimiento de las tradicionales regiones del cultivo han permitido registrar este aumento excepcional. Esto obedece a varios motivos, entre los que se encuentran: una alternativa de cultivo en invierno con una leguminosa que aporta nitrógeno al suelo, requerimiento de humedad bajo (entre 300-400 mm de agua en su ciclo), un precio de venta interesante, y una importante y creciente demanda internacional. Con esto, Argentina pasó de ser un mero productor interno a ser un exportador importante a nivel mundial. El principal destino de nuestras exportaciones es la Unión Europea, luego le siguen Turquía e Israel. En relación con los tradicionales países compradores de garbanzo argentino encontramos a Brasil, Chile y Colombia (De Bernardi, 2016).

En la provincia de Tucumán el cultivo de garbanzo está en expansión (en 2017 se sembraron alrededor de 25.000 ha) con excelentes perspectivas de comercialización y es importante destacar el mayor conocimiento alcanzado por los productores en el manejo del cultivo y los avances tecnológicos en los últimos años respecto a la creación de nuevas variedades que cumplen con las demandas más exigentes de los países de Europa (Vizgarra, 2017).

La cantidad de nutrientes extraídos por las cosechas puede ser elevada y es donde la actividad de la microflora benéfica del suelo debe ser suficiente para satisfacer los requerimientos nutricionales de los cultivos. La búsqueda de alternativas que ayuden a minimizar el efecto adverso de los fertilizantes químicos es de gran interés hoy en día para la agricultura. En este contexto, los avances de la biotecnología han permitido encontrar soluciones eficaces utilizando microorganismos como una alternativa a la aplicación de fertilizantes minerales (Guzmán *et al.*, 2012).

En un sistema agrícola, los microorganismos desempeñan diversas funciones que responden a

la composición biológica del suelo, la competencia entre ellos y al reconocimiento planta microorganismo. De igual modo, las propiedades físico-químicas del suelo y el clima influyen en el tipo de interacciones y la determinación de los efectos determinantes en el desarrollo de los vegetales (Radjacommare *et al.*, 2010).

Algunos microorganismos, especialmente los asociados con las raíces tienen la habilidad de incrementar el crecimiento de las plantas y su productividad; estos son reconocidos como PGPR por sus siglas en inglés (Plant growth promoting rhizobacteria) (Kloepper y Schroth, 1978).

Las PGPR pueden ser utilizadas como biofertilizantes mejorando la disponibilidad de nutrientes; fitoestimulantes ya que promueven el crecimiento a través de la producción de fitohormonas y biocontroladoras por la producción de antibióticos, antifúngicos o enzimas líticas y la inducción de la respuesta de defensa de las plantas (Kloepper *et al.*, 1989). Estos microorganismos son utilizados cada vez más en la producción agrícola por sus aportes a los cultivos a través de diferentes mecanismos de acción, como pueden ser: fijación biológica de nitrógeno (García de Salamone, 2012), solubilización de fosfatos (Restrepo-Franco *et al.*, 2014; Patiño-Torres, 2014), producción de fitohormonas (Lugtenberg y Kamilova, 2009), producción de sideróforos (Shen *et al.*, 2013; Sasirekha, y Shivakumar, 2016) y acción biocontroladora sobre otros microorganismos perjudiciales (Bhattacharyya y Jha, 2012; Molina-Romero *et al.*, 2015).

En muchos casos, los microorganismos presentan uno o más tipos de interacciones para disminuir o prevenir los efectos deletéreos causados por organismos fitopatógenos. La supresión de enfermedades por biocontrol ocurre como resultado de la manifestación de interacciones entre la planta, el patógeno y las condiciones ambientales (Siddiqui, 2006).

La expresión de la capacidad promotora del crecimiento de las plantas inoculadas con PGPR en ensayos de laboratorio, invernadero y campo ha sido evaluada a través de diversas variables, tales como el incremento de la elongación del tallo y de las raíces, el estado nutricional de las plantas tratadas, la ganancia en materia seca, el contenido de proteínas y el valor nutricional del grano (Tilaky Srinivasa, 2006).

Numerosos investigadores han demostrado el potencial biotecnológico de la aplicación de PGPR en diferentes cultivos. Entre ellos, Banerjee

et al. (2010), Cabra Cendales *et al.* (2017) y Nasal *et al.* (2018) en tomate; Viruel *et al.* (2014) y García *et al.* (2015) en maíz; Peralta *et al.* (2014) en batata; Buono *et al.* (2016) en tabaco y pimienta; Delaporte-Quintana *et al.* (2017) en frutilla y Rodríguez *et al.* (2018) en yacón.

En relación con el cultivo del garbanzo, se ha estudiado que la coinoculación de rizobios - PGPR produce aumento del número de nódulos, de la fijación biológica de nitrógeno, mejora la respuesta a situaciones de estrés, etc. En este sentido, Ortega-García *et al.* (2016) obtuvieron resultados promisorios de la interacción de *Mesorhizobium* sp. y *Bacillus* sp., solubilizador de fósforo, en dos variedades de garbanzo demostrando así la posibilidad de utilizar esta alternativa para la mejora de la nutrición del cultivo. Estas asociaciones confieren a la tecnología del cultivo un componente de sostenibilidad, al influir en el beneficio económico del garbanzo por concepto de ahorro de fertilizantes nitrogenados y disminución del efecto contaminante del producto químico.

En la provincia de Tucumán, resultados preliminares demostraron el efecto de la coinoculación con diferentes formulaciones comerciales de microorganismos promotores de crecimiento sobre la nodulación y la productividad del cultivo de garbanzo (Amigo *et al.*, 2013).

Las evidencias demuestran el efecto estimulante para la planta de la inoculación bacteriana, lo que estaría indicando que este cultivo presenta una fuerte dependencia de esta práctica, y se destaca la conveniencia de la adopción de tecnologías modernas del uso de inoculantes para el sostenimiento de altos rendimientos en el cultivo de garbanzo en la región del NOA.

La agricultura sustentable es la principal estrategia para contrarrestar el rápido declive de la calidad ambiental por medio del mantenimiento del equilibrio de los agroecosistemas (Muleta *et al.*, 2013). En este contexto, el uso de enmiendas microbianas representa una alternativa a la aplicación de fertilizantes químicos. Las bacterias nativas constituyen una excelente fuente para la selección de nuevas cepas y los distintos suelos pueden albergar estirpes con capacidad para promover el crecimiento vegetal. Sobre la base de los antecedentes enunciados se plantea que la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal nativas mejora el crecimiento y desarrollo del cultivo del garbanzo.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar rizo-

bacterias nativas en base a su capacidad de solubilizar fosfatos, fijar nitrógeno atmosférico, producir sideróforos y actuar como agentes de biocontrol, y evaluar su desempeño como promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de garbanzo en condiciones controladas, a fin de obtener un potencial bioinsumo que maximice los beneficios en la producción.

Materiales y métodos

Se trabajó con seis aislamientos caracterizados por su morfología como Ba (bacilo móvil, Gram+): Pf, YM₁, YM₃, YM₄ (bacilos móviles Gram-) y Me, un nuevo aislamiento a partir de nódulos de garbanzo. En todos los casos se procedió a la caracterización de los aislamientos por sus propiedades como PGPR.

Solubilización de diferentes fuentes de fosfatos insolubles

La capacidad potencial de solubilización de fosfatos se evaluó a través del índice de solubilización (IS). Para ello, los aislamientos se sembraron en medio de cultivo NBRIP (Nautiyal, 1999) sólido, suplementado con fosfato tricálcico, escorias Thomas y fosfato de hierro 3⁺. Se incubaron en estufa a 28 °C durante 6 a 11 días hasta la aparición de halos transparentes alrededor de la zona de crecimiento que indican la solubilización del fosfato. Se midieron los diámetros de las colonias y los diámetros de los halos en tres direcciones, se calculó la media aritmética y se determinó el índice de solubilización con la fórmula:

$$IS = \frac{\text{Diámetro total (colonia + halo)}}{\text{diámetro colonia}}$$
 (Edi-Premono *et al.*, 1996).

Solubilización de fosfato tricálcico en medio de cultivo líquido

Para demostrar la capacidad de los aislamientos para solubilizar fosfato tricálcico se cultivaron los aislamientos en medio líquido y se registró la solubilización de fosfato tricálcico a lo largo del tiempo. Para ello, se inocularon 5 ml de cada suspensión en erlenmeyers con 100 ml de medio de cultivo NBRIP líquido y se incubó por 11 días a 28 °C con agitación. Se tomó una muestra de aproximadamente 20 ml por cultivo en los días 0, 3, 5, 7 y 11 (Estrada, 2013). Cada muestra se centrifugó durante 20 minutos y en el sobrenadante se determinó el fósforo soluble por el método del azul fosfomolibdato (Murphy y Riley, 1962).

Evaluación de la capacidad de fijación de nitrógeno in vitro

Con el fin de evaluar la capacidad potencial para fijar nitrógeno atmosférico, los aislamientos se hicieron crecer en medio de cultivo NFB libre de nitrógeno. La positividad se evidenció por la formación de una película a la altura del menisco y por el cambio de color del medio de cultivo. A los que dieron positivos durante cinco repiques sucesivos se les determinó la actividad de la enzima nitrógenasa por la técnica de reducción de acetileno. Para ello, se sembraron 20 µl de cada suspensión en 5 ml de medio NFB semisólido. Luego de 24 horas de incubación a 28 °C el 10 % del volumen de aire del frasco se reemplazó con acetileno al 1 % y se incubó durante 24 horas. La determinación de etileno se realizó con un cromatógrafo gaseoso Agilent 6890 N Network GC Systemy. La cuantificación se realizó en base a una curva patrón con diferentes cantidades de etileno puro y se expresó como moles de etileno g⁻¹ de masa aérea.

Producción de sideróforos

La producción de sideróforos se evaluó utilizando la técnica universal del Cromo Azurol Sulfonato (CAS) que se basa en el cambio de color que ocurre cuando el hierro del complejo CAS-hierro es captado por el sideróforo bacteriano (Schwyn y Neilands, 1987). La preparación de los reactivos se realizó en recipientes desferrados con HCl 1M. Se sembraron 10 µl de las diferentes suspensiones en el medio CAS y se incubaron durante cinco días a 30 °C. La producción de sideróforos se observó por la aparición de halos de color naranja alrededor de las colonias. La eficiencia de producción de sideróforos (EPS) para cada aislado se calculó con la siguiente fórmula: $[(Dh-Dc)/Dc] \times 100$, donde Dh corresponde al diámetro del halo y Dc corresponde al diámetro de la colonia.

Determinación de la actividad antagonista in vitro

Para determinar si los aislamientos presentaron actividad antagónica in vitro contra *Fusarium* (FUS003) y *Macrophomina* (SOJ-BAL; FRU-ERLI), se realizó una prueba de crecimiento dual en el medio de cultivo PDA (agar papa dextrosa). A partir de los cultivos frescos de los hongos *Macrophomina* y *Fusarium*, se extrajeron con sacabocados discos de 5 mm de diámetro conteniendo el micelio del hongo y el medio de cultivo subya-

cente. Se colocó en un extremo de la caja de Petri el disco de micelio del patógeno y a 5 cm de distancia el inóculo de los aislados. Como control se utilizó un disco con micelio fúngico, sin los aislamientos. Se incubaron durante 7 días a 29 °C, posteriormente se midió el diámetro del crecimiento fúngico en presencia de las bacterias y en los controles. El porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico (IF), se determinó empleando la fórmula: $IF (\%) = (DCC - DCT / DCC) \times 100$, donde DCC es el diámetro de crecimiento del hongo en la caja control y DCT es el diámetro de crecimiento del hongo en presencia de la bacteria (Flores-Bazauri *et al.*, 2015).

Evaluación de la promoción del crecimiento de garbanzo en condiciones controladas

La capacidad de los aislados de promover el crecimiento se evaluó con semillas de garbanzo var. Chañarito, las cuales fueron desinfectadas superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 4 %, luego se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se colocaron en estufa a 20 °C durante tres días para su pregerminación antes de la inoculación con las suspensiones bacterianas. Los inóculos se prepararon a partir de cultivos crecidos en medio TSA (tripteína soja agar), se lavaron, centrifugaron y resuspendieron en agua destilada estéril hasta obtener un título de 10⁸ UFC/ml. Las semillas pregerminadas se inocularon por inmersión en cada suspensión durante 20 minutos y se colocaron en macetas con vermiculita estéril siguiendo un diseño totalmente al azar con cuatro repeticiones. Como controles se emplearon semillas pregerminadas tratadas con agua destilada estéril. Los tratamientos fueron: T0: Testigo semillas pregerminadas tratadas con agua destilada estéril; T1: inoculado con YM₁; T2: inoculado con YM₃; T3: inoculado con YM₄; T4: inoculado con Ba; T5: inoculado con Pf y T6: inoculado con Me. Todos los tratamientos se colocaron en cámara de cría con temperatura de 22 ± 2 °C, humedad 25 % y fotoperiodo 16/8 horas (luz/oscuridad) y se regaron semanalmente con una solución nutritiva compuesta por: CaCl₂ 2H₂O (1 %) 11 ml; KNO₃ (101,1 g/l) 6 ml; MgSO₄ 7H₂O 0,12 g; K₂HPO₄ 0,21 g; KH₂PO₄ 0,1 g; Fe-EDTA Na₂ [64 mM (Fe 10 %)] 0,5 ml; Solución de micronutrientes (H₃BO₃ 0,31 g; ZnSO₄ 7H₂O 0,05 g; CuSO₄ 5H₂O 0,22 g; KCl 0,041 g; NaMoO₄ 0,01 g; agua destilada 1.000 ml) 2 ml; agua destilada hasta volumen final 1.000 ml (Fahraeus, 1957).

VARIABLES ANALIZADAS

A los 45 días posteriores a la inoculación las variables analizadas fueron: altura de planta medida en cm desde la base del tallo; porcentaje de fósforo foliar (en un laboratorio privado) a partir de una muestra compuesta con la totalidad de las hojas para cada tratamiento; peso seco de la parte aérea y de raíces por secado en estufa a 60°C hasta peso constante y longitud de raíces medida en cm. Los resultados se analizaron mediante análisis de la varianza seguido de la prueba LSD de Fisher a fin de detectar diferencias entre medias para los distintos tratamientos. Se trabajó con un nivel de significación del 5 % con el paquete estadístico Infostat (Di Rienzo, 2011).

Resultados y discusión

Solubilización de diferentes fuentes de fosfatos insolubles

El índice de solubilización (IS) permite tener una aproximación de la capacidad solubilizadora de fosfato por parte de un microorganismo y se detalla en la Tabla 1.

Los valores de fosfato tricálcico fueron similares a los reportados por Angulo *et al.*, (2014) quienes obtuvieron IS de 2,0 para *Rahnella aquatilis* y 1,19 para *B. amyloliquefaciens* aisladas de rizósfera de *Eucalyptus nitens*. En este trabajo Pf registró el mayor índice de solubilización (3,69) y con la misma técnica, Mishra *et al.* (2015) obtuvieron un IS de 1,8 para *Pseudomonas* sp. aislada de la rizósfera de hinojo (*Foeniculum vulgare* Mill.). YM₃ creció en el medio de cultivo sin desarrollar halo de solubilización. En cuanto al hierro, ningún aislado fue capaz de crecer en medio NBRIP suplementado con fosfato de hierro y solo Pf, YM₄ e YM₁ crecieron y formaron halo en el medio suplementado con escorias Thomas.

Bashan *et al.* (2013) consideran que el fosfato tricálcico no es determinante como un factor de selección universal de bacterias solubilizadoras de fosfato y posterior prueba de su efecto promotor del crecimiento vegetal. Sin embargo, otros autores coinciden en que la técnica de agar en placa y medición de halos es un método adecuado para aislar y caracterizar un elevado número de cepas con capacidad de solubilización (Patiño-Torres, 2010).

Solubilización de fosfato tricálcico en medio de cultivo líquido

La evolución de la solubilización del fosfato tricálcico realizada en medio de cultivo NBRIP líquido y expresada en mg P/l solución se aprecia en la Figura 1.

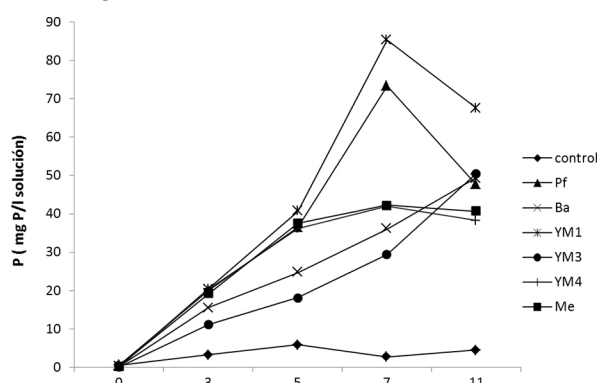


Figura 1. Evolución de la solubilización de fosfato tricálcico realizada durante 11 días en medio de cultivo NBRIP líquido para cada aislamiento.

Los aislamientos que solubilizaron mayor cantidad de fosfato tricálcico fueron YM₁ y Pf (85,3 y 73,4 mg P/l de solución, respectivamente) a los siete días de incubación. De igual modo, YM₄ y Me presentan un máximo de solubilización de 42,0 y 42,3 a los siete días. YM₃ y Ba presentan el máximo de solubilización en el día 11 (50,4 y 49,3 respectivamente), momento en el cual los otros comienzan a decrecer debido probablemente a la disminución del pH y al consumo del fosfato

Tabla 1. Índice de solubilización de fosfato tricálcico y de Escorias Tomas, reducción de acetileno y eficiencia de producción de sideróforos (EPS) de los aislamientos. Se presentan las medias ± error estándar salvo para reducción de acetileno.

Aislamiento	Fosfato tricálcico	Escorias Tomas	Reducción de acetileno (moles etileno/g)	EPS
YM ₁	2,08 ± 0,005 b	3,01 ± 0,176 ab	0,2435	12,44 ± 1,71 a
YM ₃ *	-	0	0,1819	57,64 ± 8,50 ab
YM ₄	2,28 ± 0,102 c	3,11 ± 0,405 b	0,3898	12,86 ± 1,23 a
Pf	3,69 ± 0,253 d	2,78 ± 0,349 a	0,4452	85,22 ± 12,00 b
Ba	1,80 ± 0,464 a	0	0,4063	65,00 ± 16,43 b
Me	2,16 ± 0,015 b	0	No determinado	183,33 ± 98,32 c

*No presentó halo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05) según prueba LSD de Fisher.

en el tiempo del ensayo. En la Tabla 1 de Índice de Solubilización, se muestra que YM₃ no presenta halo de solubilización, sin embargo, en medio líquido solubilizó hasta 50,4 mg P/l. Al respecto, Whitelaw (1999) indica que la ausencia de halos de solubilización en los medios de cultivo sólidos no necesariamente determina que el organismo carezca de esta habilidad, sino que es probable que el medio no sea lo suficientemente sensible para detectar la actividad de algunos microorganismos y sugiere la necesidad de recurrir a los medios líquidos para obtener resultados más precisos.

Evaluación de la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico

La capacidad de los aislamientos para crecer en medio de cultivo libre de nitrógeno sugiere que podrían fijar el nitrógeno del aire. Pf, YM₃ y Ba crecieron en medio de cultivo libre de nitrógeno durante cinco repiques sucesivos, por lo que se podría sugerir que son capaces de fijar este elemento. Estos resultados concuerdan con los de León-Mendoza (2014) que aisló enterobacterias de la rizósfera de maíz y determinó que el 96 % de ellas fijaron nitrógeno *in vitro*, evidenciado por la formación de una película blanquecina en la superficie del medio y por el viraje del indicador a azul. El crecimiento en medio de cultivo libre de nitrógeno no es determinante de la capacidad fijadora de un microorganismo. Uno de los modos para demostrar esta propiedad es a través de la prueba de reducción de acetileno (ARA) que indica la actividad de la enzima nitrogenasa. Los resultados se aprecian en la Tabla 1. Estos resultados demuestran que tanto YM₁, YM₃, YM₄, Ba y Pf presentan actividad nitrogenasa, lo que las caracterizaría como fijadoras de nitrógeno atmosférico.

Producción de sideróforos

La producción de sideróforos es una característica muy extendida entre las rizobacterias y cuya síntesis permite a las bacterias productoras com-

petir favorablemente frente a otros microorganismos por hierro y también se ha relacionado con el control de patógenos del suelo (Crowley, 2006; Aguado-Santacruz, 2012). En este trabajo se demuestra que las seis bacterias analizadas produjeron sideróforos, como lo expresado por otros autores para diferentes bacterias (Babana *et al.*, 2013; Sánchez López *et al.*, 2014).

El resultado de la determinación de la eficiencia de producción de sideróforos se registra en la Tabla 1, destacándose Me con una EPS de 183,33 ± 98,32. La EPS de YM₁ e YM₄ fue inferior a 50 como lo registrado por Parra-Cota *et al.* (2018) en bacterias aisladas del Valle del Yaqui, México, de las cuales 100 cepas tuvieron una EPS menor a 50 y 10 cepas mayor a 100.

Determinación de actividad antagonista in vitro

La actividad antagonista de los aislados en estudio determinada por el porcentaje de inhibición fúngica (IF) frente a tres hongos fitopatógenos, se registra en la Tabla 2.

En esta experiencia, los aislados Ba y Me mostraron inhibición del micelio de los tres hongos fitopatógenos ensayados (Tabla 2 y Figura 2), coincidentemente con la mayor eficiencia de producción de sideróforos (EPS) de estas bacterias, registrada en Tabla 1. Los valores de IF varían entre 38 % y 48 % coincidiendo con las investigaciones de Sagolshemcha *et al.* (2017) quienes trabajaron con cepas de rizobios que en ensayos *in vitro* exhibieron actividad antagonista sin alcanzar inhibición completa de *Macrophomina*.

Evaluación de la promoción del crecimiento de garbanzo en condiciones controladas

A los 45 días de la inoculación y siembra se evaluaron altura de planta, peso seco de parte aérea y de raíz y contenido de fósforo foliar.

En numerosas investigaciones se informa sobre el efecto positivo de la inoculación, con rizobacterias, sobre distintos parámetros de crecimiento ve-

Tabla 2. Porcentaje de inhibición fúngica (IF) *in vitro*, para cada aislamiento (media ± error estándar).

Aislamiento	FUS 003	FruErli	Soj-Bal
Ba	47,77 ± 9,09 b	37,77 ± 2,46 b	43,33 ± 2,46 b
Me	38,00 ± 2,36 a	40,74 ± 6,70 b	38,49 ± 6,00 a
YM ₄	0	26,29 ± 1,70 a	0
YM ₃	0	0	0
YM ₁	0	0	0
Pf	0	0	0
Control	0	0	0

FUS 003: *Fusarium*; FruErli y Soj-Bal: *Macrophomina*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) según prueba LSD de Fisher.

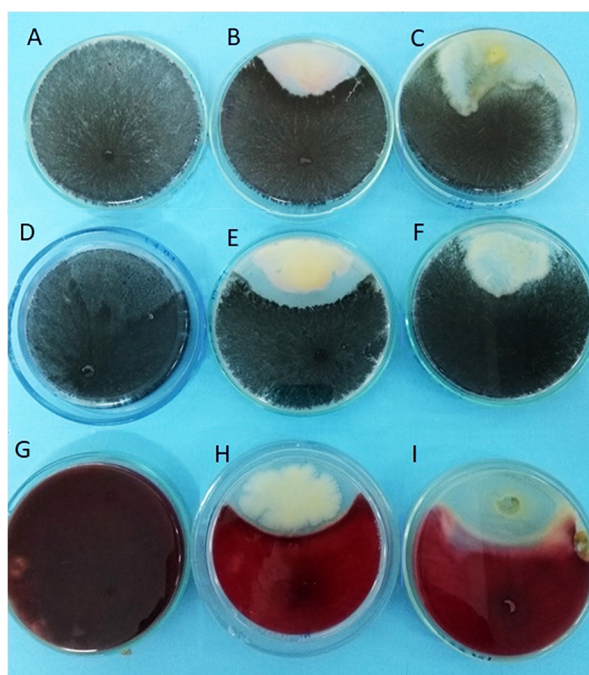


Figura 2. Pruebas de antagonismo *in vitro*. A) Testigo Fru Erli; B) Ba vs Fru Erli; C) Me vs Fru Erli; D) Testigo Soj-Bal; E) Ba vs Soj-Bal; F) Me vs Soj-Bal; G) Testigo FUS 003; H) Ba vs FUS003; I) Me vs FUS003. FUS 003: *Fusarium*; FruErli y Soj-Bal: *Macrophomina*.

getal. Los resultados de esta experiencia muestran que en todos los tratamientos inoculados con los aislados en estudio, se incrementaron la altura de planta y peso seco de parte aérea y de raíz en relación al control sin inocular (Tabla 3). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por numerosos autores como Saharan y Nehra (2011), quienes sostienen que la inoculación con bacterias promotoras de crecimiento puede beneficiar a las plantas en el estado vegetativo potenciando la emergencia, vigor, altura, peso de la planta, disponibilidad de nutrientes y aumento en la clorofila. Asimismo, García *et al.* (2015) registraron incrementos en peso seco, y longitud de tallo y raíz en maíz inoculado con *Pseudomonas* sp. y Rodríguez *et al.* (2018) revelaron también incrementos en longitud de tallo, número de hojas, peso seco de parte aérea,

longitud y peso seco de raíces de yacón inoculadas con rizobacterias nativas. En relación al contenido de fósforo foliar, los plantines de garbanzo inoculados con los aislados en estudio, presentan mayor porcentaje de fósforo en parte aérea con respecto a los controles tratados con agua destilada estéril. Este hecho es esperable ya que todos los aislados son capaces de solubilizar este elemento. Resultados similares fueron obtenidos por Sánchez López *et al.* (2014) que demostraron que el contenido de fósforo foliar en lechuga aumenta al ser inoculadas con *Pseudomonas fluorescens*.

Conclusiones

Los resultados encontrados en este trabajo demuestran que todos los aislamientos analizados presentan características de promoción de crecimiento vegetal. Ba, Pf, YM₁, YM₃, YM₄ y Me, solubilizan fosfato tricálcico y producen sideróforos. Ba, Pf, YM₁, YM₃, YM₄, presentan actividad nitrogenasa, y Ba, Me y YM₄ producen inhibición de micelio fúngico. Además, como consecuencia de la inoculación con estos aislamientos, en condiciones controladas, se incrementaron altura de planta, contenido de fósforo foliar y peso seco de parte aérea y raíces, desempeño que los hace promisorios para su uso como potencial bioinsumo en garbanzo. Más estudios deben realizarse para evaluar y comprobar el efecto promotor del crecimiento en condiciones de invernadero y campo.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el programa PIUNT 26 A 621. Se agradece al Dr. Sergio Salazar por la provisión de los hongos fitopatógenos y a la Ing. Agr. Josefina Amigo por la provisión del aislado Me.

Tabla 3. Parámetros de crecimiento: altura y peso seco de parte aérea (media ± error estándar), porcentaje de fósforo foliar, longitud y peso seco de raíces (media ± error estándar) de plantines de garbanzo a los 45 días del tratamiento con los aislamientos.

Tratamiento	Altura de planta (cm)	Peso seco de la parte aérea (g)	Fósforo foliar (%)	Longitud de raíz (cm)	Peso seco de raíz (g)
Control	19,67 ± 2,51 a	0,23 ± 0,06 a	0,21	15,66 ± 5,13 a	0,10 ± 0,06 a
YM ₁	27,83 ± 1,96 b	0,29 ± 0,05 ab	0,28	21,85 ± 10,16 a	0,15 ± 0,02 b
YM ₃	30,67 ± 2,51 b	0,37 ± 0,03 b	0,29	20,00 ± 1,00 a	0,23 ± 0,01 b
YM ₄	26,50 ± 3,53 b	0,34 ± 0,05 ab	0,33	22,35 ± 2,47 a	0,18 ± 0,04 b
Ba	25,33 ± 2,51 b	0,30 ± 0,07 ab	0,28	14,83 ± 3,23 a	0,18 ± 0,04 b
Pf	26,87 ± 4,87 b	0,30 ± 0,08 ab	0,28	18,62 ± 5,94 a	0,18 ± 0,03 b
Me	28,63 ± 5,62 b	0,35 ± 0,04 b	0,33	12,25 ± 1,65 a	0,20 ± 0,02 b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) según prueba LSD de Fisher.

Referencias bibliográficas

- Aguado-Santacruz G.A., Moreno-Gómez B., Jiménez-Francisco B., García-Moya E., Preciado-Ortiz R.E. (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35 (1): 9-21.
- Amigo J., González Fiqueni M.F., Ulla E.L., Argiro E., Durman S., Plano M., Infante Cipri L., López L., Espejo R., Pérez M.F. (2013). Efecto de la coinoculación con PGPM de los géneros *Mesorhizobium* y *Pseudomonas* en el cultivo de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el NOA. IX Reunión Nacional Científico Técnica de Biología de Suelos. I Congreso Nacional de Biología Molecular de Suelos. 4-6 de septiembre, Santiago del Estero, Argentina.
- Angulo V.C., Sanfuentes E.A., Rodríguez F., Sossa K.E. (2014). Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Revista Argentina de Microbiología* 46 (4): 338-347.
- Babana A.H., Dicko A.H., Maïga K., Traoré D. (2013). Characterization of rock phosphate-solubilizing microorganisms isolated from wheat (*Triticum aestivum* L.) rhizosphere in Mali. *Journal of Microbiology and Microbial Research* 1 (1): 1-6.
- 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.
- Bashan Y., Kamnev A., de-Bashan L.E. (2013). Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biology and Fertility of Soils* 49: 465-479.
- Bhattacharyya P.N., Jha D.K. (2012). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 1327-1350.
- Buono N.I., Ulla E.L. (2016). Efectos de la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfato en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y pimiento (*Capsicum annum* L.) en condiciones controladas. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino* 36 (2): 45-54.
- Cabra Cendales T., Rodríguez González C.A., Villota Cuásquer C.P., Tapasco Alzate O.A., Hernández Rodríguez A. (2017). *Bacillus* effect on the germination and growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *Acta Biológica Colombiana* 22 (1): 37-44.
- Crowley D.E. (2006). Microbial siderophores in the plant rhizosphere. En: Iron, Nutrition in Plants and Rhizosphere Microorganisms. Barton L.L., Abadia J. (Eds). Springer, EEUU. Pp. 169-198.
- De Bernardi L. (2016). Informe de Garbanzo (*Cicer arietinum*). En: Dirección de Marcados Agrícolas. Subsecretaría de Mercados Agropecuarios, <https://www.agroindustria.gob.ar/new/0-0/programas/dma/granos/Informe-Garbanzo%202016.pdf>, consulta: septiembre 2019.
- Delaporte-Quintana P., Grillo-Puertas M., Lovaisa N.C., Texeira K.R., Rapisarda V.A., Pedraza R.O. (2017). Contribution of *Gluconacetobacter diazotrophicus* to phosphorus nutrition in strawberry plants. *Plant and Soil* 419: 335-347.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., González L., Tablada M., Robledo Y.C. (2011). InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. En: <http://www.infostat.com.ar>.
- Edi-Premono M., Moawad A.M., Vlek P.L.G. (1996). Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indonesian Journal of Agricultural Science* 11: 13-23.
- Estrada G.A., Divan Baldani V.L., Messias de Oliveira D., 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.
- Flores-Bazauri W., Chico-Ruiz J., Cerna-Rebaza L. (2015). Actividad antagonica *in vitro* de *Clonostachys rocea* sobre *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea*. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo* 35 (1): 34-42.
- Fahraeus G. (1957). The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *Journal of General Microbiology* 16: 374-381.
- García R.A., Lovaisa N.C., Ulla E.L. (2015). Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfatos del Noroeste Argentino y su efecto en la promoción de crecimiento en maíz (*Zea mays* L.). *Revista Agronómica del Noroeste Argentino* 35 (1): 13-28.
- García de Salamone I.E. (2010). Microorganismos promotores del crecimiento vegetal. XII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. 17-19 de noviembre, Santo Domingo, Ecuador. Pp. 1-9.
- Guzmán A., Obando M., Rivera D., Bonilla R. (2012). Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). *Revista Colombiana de Biotecnología* 14 (1): 182-190.
- Kloepper J.W., Schroth M.N. (1978). Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. *Proceedings of the 4th International Conference on Plants Pathogenic Bacteria, Angers, France* 2: 879-882.
- Kloepper J.W., Lifshitz R., Zablotowicz R.M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop pro-

- ductivity. *Tibtech* 7: 39-44.
- León-Mendoza L.H. (2014). Determinación del potencial promotor del crecimiento vegetal de las enterobacterias aisladas de la rizósfera del cultivo de maíz (*Zea mays* L.). *Scientia Agropecuaria* 5 (4):177-185.
- Lugtenberg B., Kamilova F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* 63: 541-556.
- Medina J.N., Yam Chimal C., Borges Gómez L., Zúñiga Aguilar J.J., Godoy Hernández G. (2014). Aislados Bacterianos con Potencial Biofertilizante para plántulas de Tomate. *Terra Latinoamericana* 32: 273-281.
- Mishra B.K., Singh B., Singh P., Rathore S.S., Aishwath O.P., Kant K., Dubey P.N. (2015). Isolation and evaluation of phosphate solubilizing microorganisms from fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) rhizospheric soils of Rajasthan. *International Journal of Seed Spices* 5 (1): 71-75.
- Molina-Romero D., Bustillos-Cristales M.R., Rodríguez-Andrade O., Morales-García Y.E., Santiago-Sáenz Y., Castañeda-Lucio M., Muñoz-Rojas J. (2015). Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biológicas* 17 (2): 24-34.
- Muleta D., Assefa F., Börjesson E., Granhall U. (2013). Phosphate-solubilising rhizobacteria associated with *Coffea arabica* L. in natural coffee forest of south western Ethiopia. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 12 (1): 73-84.
- Murphy J., Riley H.P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27: 31-36.
- Nassal D., Spohn M., Eltlbany N., Jacquiod S., Smalla K., Marhan S., Kandeler E. (2018). Effects of phosphorus-mobilizing bacteria on tomato growth and soil microbial activity. *Plant and Soil* 427 (1-2): 17-37.
- Nautiyal C.S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170: 265-70.
- Ortega-García M., Shagarodsky Scull T., Dibut Álvarez B.L., Ríos Rocafull Y., Tejada González G., Gómez Jorrin L.A. (2016). Influencia de la interacción entre el cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) y la inoculación con cepas seleccionadas de *Mesorhizobium* spp. *Cultivos Tropicales* 37: 20-27.
- Parra-Cota F.I., Coronel-Acosta C.B., Amézquita-Avilés C.F., de los Santos-Villalobos S., Escalante-Martínez D.I. (2018). Diversidad metabólica de microorganismos edáficos asociados al cultivo de maíz en el Valle del Yaqui, Sonora. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 9 (2): 431-442.
- Patiño-Torres C.O., Sanclemente-Reyes O.E. (2014). Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. *Entramado* 10 (2): 288-297.
- Peralta J.M., Ulla E.L., Zamudio N.M., Borioni R.H. (2014). Rizobacterias solubilizadoras de fosfatos inoculadas en dos cvs de batata (*Ipomoea batatas* L. Lam). *Revista Agronómica del Noroeste Argentino* 34 (2): 169-171.
- Radjacommare R., Venkatesan S., Samiyappan R. (2010). Biological control of phytopathogenic fungi of vanilla through lytic action of *Trichoderma* species and *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology and Plant Protection* 43 (1): 1-17.
- Restrepo-Franco G.M., Marulanda-Moreno S., de la Fe-Pérez Y., Díaz-de la Osa A., Baldani V.L., Hernández-Rodríguez A. (2014). 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.
- Rodríguez P.I., Aldonate M.L., Ulla E.L. (2018). Bacterias solubilizadoras de fosfatos asociadas a la rizósfera de yacón [*Smallanthus sonchifolius* (Poeppig) Robinson] y su capacidad para promover el crecimiento vegetal. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino* 38 (2): 75-8.
- Sagolshemcha R., Devi Y.N., Singh W.R. (2017). Plant growth promoting effect and Biocontrol potential of *Rhizobium* spp. against *Macrophomina phaseolina*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6 (6): 2695-2701.
- Saharan B.S., Nehra V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sciences and Medicine Research* 21 (1): 1-30.
- Sánchez López D.B., García Hoyos A.M., Romero Perdomo F.A., Bonilla Buitrago R.R. (2014). Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal solubilizadoras de fosfato en *Lactuca sativa* cultivar White Boston. *Revista Colombiana de Biotecnología* 16 (2): 122-128.
- Sasirekha B., Srividya S. (2016). Siderophore production by *Pseudomonas aeruginosa* FP6, a biocontrol strain for *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing diseases in chilli. *Agriculture and Natural Resources* 50 (4): 250-256.
- Shen X., Hu H., Peng H., Wang W., Zhang X. (2013). Comparative genomics analysis of four representative plant growth-promoting rhizobacteria in *Pseudomonas*. *BMC Genomics* 14: 271.
- Siddiqui Z.A. (2006). PGPR: prospective biocontrol agents of plant pathogens. En: PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Siddiqui Z.A. (Ed.). Springer, EEUU. Pp. 111-142.
- Schwyn B., Neilands J. (1987). Universal Chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160: 47-56.
- Tilak K., Srinivasa B. (2006). *Bacillus cereus* and *B. circulans* novel inoculants for crops. *Current Science* 90: 642-644.
- Vizgarra O.N., Espeche C.M., Mamaní Gonzales S.Y.,

- Ploper L.D. (2017). TUC 403 y TUC 464, dos nuevas variedades de garbanzo tipo Kabuli para el Noroeste Argentino. *Revista Producción Agroindustrial del NOA Transporte y Comercio Exterior* 94 (1): 41-47.
- Viruel E., Erazzú L.E., Martínez Calsina L., Ferrero M.A., Lucca M.E., Siñeriz F. (2014). Inoculation of maize with phosphate solubilizing bacteria: effect on plant growth and yield. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 14 (4): 819-831.
- Whitelaw M.A. (1999). Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. *Advances in Agronomy* 69: 99-151.