

EFECTO DE BACTERIAS RIZOSFÉRICAS EN LA GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DEL PIMENTÓN *Capsicum annuum* L. VAR. CACIQUE GIGANTE

María Eugenia Marquina¹, Yuri Ramírez¹ y Yulimar Castro¹

RESUMEN

La inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) representa una alternativa para incrementar la germinación y mejorar la producción de cultivos hortícolas. En este estudio se evaluó el efecto de seis aislados bacterianos rizosféricos nativos del estado Mérida, Venezuela, en la germinación del pimentón var. Cacique Gigante. Posteriormente, se seleccionaron los cuatro mejores aislados para valorar su efecto sobre el crecimiento de la planta. Se realizaron pruebas de solubilización de fosfatos y se determinó la producción de ácido indol acético (AIA) con tres concentraciones de triptófano: 0,025; 0,05 y 0,10 mg·L⁻¹. El ensayo de germinación se realizó en cápsulas de Petri bajo condiciones asépticas, utilizando semillas desinfectadas e inoculadas con 10⁸ UFC·mL⁻¹ de cada cepa, a 28 °C en oscuridad. El crecimiento se valoró en plantas *in vitro* en medio MS con o sin triptófano (0,05 mgL⁻¹) a 25 °C con 16/8 horas luz/oscuridad. Se encontró que todas las cepas solubilizaron Ca₃(PO₄)₂ y que Leu2A(1)2, YAC1, Nod2R y ME01 produjeron AIA, con y sin triptófano. Las semillas que, luego de su almacenamiento, habían disminuido su viabilidad de 98 a 75 % fueron estimuladas por las rizobacterias e incrementaron la germinación entre 13 y 23 %. Además, aceleraron en un día la máxima germinación respecto al control. Luego de 55 días de crecimiento, se registraron incrementos en longitud y peso seco de raíz y vástago de plantas inoculadas con YAC1 y Leu2A(1)2 que habían recibido aplicaciones de triptófano. Se demostró que la inoculación de semillas de pimentón con rizobacterias, especialmente con Leu2A(1)2, representa una alternativa para incrementar su germinación y posterior crecimiento de la planta.

Palabras clave adicionales: AIA, *Azospirillum*, rizobios, solubilización de fosfato

ABSTRACT

Effect of rhizosphere bacteria on germination and growth of bell pepper *Capsicum annuum* L. var. Cacique Gigante

Inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) represents an alternative to increase the germination and improve the production of horticultural crops. In this study the effect of six rhizosphere bacterial isolates native to Merida, Venezuela was evaluated over the germination of bell pepper var. Cacique Gigante. Then, the best four isolates were selected to evaluate the effect on plant growth. A phosphate solubilization test was performed and the production of AIA was determined with three concentrations of tryptophan (0.025, 0.05, and 0.1 mg·L⁻¹). The germination test was performed in Petri dishes under aseptic conditions, inoculating the disinfected seeds with 10⁸ UFC·mL⁻¹ of each strain at 28 °C in the dark. Growth was evaluated *in vitro* in MS medium with or without tryptophan (0.05 mg·L⁻¹) at 25 °C with 16/8 hours light/dark. As a result, all strains solubilized Ca₃(PO₄)₂, and the Leu2A(1)2, YAC1, Nod2R and ME01 rhizobacteria produced IAA, with and without tryptophan. Seeds that after storing had a viability decreased from 98 to 75 % were stimulated by the rhizobacteria, increasing germination 13-23 %. In addition, they accelerated in one day the maximum germination with respect to the control. After 55 days of growth, there were increases in length and dry weight of root and stem inoculated with YAC1 and Leu2A(1)2, and with application of tryptophan. It was demonstrated that inoculation of bell pepper seeds with rhizobacteria, especially with Leu2A(1)2, represents an alternative to increase germination and growth of the plant.

Additional key words: *Azospirillum*, IAA, phosphate solubilization, rhizobia

INTRODUCCIÓN

La agricultura convencional a base de agroquímicos suministra elementos nutricionales a las plantas y le brindan protección ante factores

bióticos adversos (patógenos y plagas) pero han generado un impacto negativo en el ambiente. Su uso indiscriminado origina contaminación de las aguas freáticas, eutrofización, emanación de gases que contribuyen al efecto invernadero,

Recibido: Enero 9, 2017

Aceptado: Septiembre 18, 2017

¹ Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes. Apdo. 5001. Mérida, Venezuela

e-mail: mariaeugeniam79@gmail.com; unsu18@hotmail.com; yulimarcastromolina@gmail.com

acumulación de sustancias tóxicas en las cadenas tróficas (Camelo et al., 2011) y alteraciones significativas en los componentes orgánicos y bióticos del suelo que modifican el equilibrio ecológico en los agroecosistemas (Reyes et al., 2008). Estos hechos han despertado gran interés y la necesidad de desarrollar estrategias para mantener una agricultura sostenible, menos agresiva con el ambiente.

Una de las alternativas que ha sido considerada es el uso de bacterias asociadas a las raíces de las plantas, denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV), definidas por Kloepper et al. (1980) como aquellas bacterias que habitan el entorno de las raíces y ejercen efectos positivos en el crecimiento y desarrollo de las plantas, a través de diferentes mecanismos directos e indirectos. Estos microorganismos pueden colonizar los espacios intercelulares de los tejidos radicales y algunos alcanzan el tejido vascular (Achari y Ramesh, 2014). En este grupo se destacan los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium* (Reyes et al., 2008), *Pseudomonas* (Kloepper et al., 1980) y *Bacillus* (Rivera, 2014).

Las rizobacterias poseen diversos mecanismos que estimulan el desarrollo vegetal, tales como la fijación del nitrógeno atmosférico, producción de fitohormonas, solubilización de fosfatos, síntesis de sideróforos que capturan el hierro y lo pueden suministrar directamente a la planta. Pueden producir ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) desaminasa, una enzima que reduce los niveles de etileno en la raíz, incrementando su longitud y crecimiento, mejora la tolerancia a la salinidad, sequía, congelamiento y toxicidad de metales, además de inducir resistencia a patógenos (Barreto et al., 2016).

Se han demostrado los efectos estimulantes de la biofertilización en la germinación, crecimiento y producción de frutos del pimentón y otras Solanáceas. Por ejemplo, Reyes et al. (2008) encontraron que las semillas de pimentón, inoculadas con rizobacterias pertenecientes a los géneros *Azotobacter* y *Rhizobium* incrementaron significativamente el porcentaje de germinación, mientras que *Azospirillum* y *Azotobacter* incrementaron el peso seco y contenido de N en el tejido de la planta. De igual manera, Di Barbaro et al. (2005) obtuvieron un mayor porcentaje de semillas germinadas de pimentón,

inoculadas con *Azospirillum brasilense*.

García et al. (2012) detectaron colonización de raíces en plantas de tomate y pimentón inoculadas con bacterias de la biovariedad *phaseoli* y *trifolii* de *Rhizobium leguminosarum*, con estimulación del crecimiento y producción de ácido indol acético (AIA) por ambas cepas y sideróforos por la biovar. *Phaseoli*. La inoculación también logró incremento del peso fresco del pimentón y mejora en la calidad del tomate al incrementar el contenido de nutrientes. También, Vazallo et al. (2013) observaron un aumento del crecimiento tanto de la raíz como el tallo en plantas de pimentón inoculadas con *R. etli*.

Luna et al. (2013) encontraron efectos estimuladores y diferenciales en la germinación y en la biomasa de pimentón por cuatro cepas de *Bacillus* sp. y Rivera (2014) registró un efecto similar al utilizar cepas de *Bacillus subtilis*.

El cultivo del pimentón presenta diferentes problemas, entre ellos, un bajo porcentaje germinativo y retraso en el tiempo de germinación, dependiendo de la variedad y estado de desarrollo de la semilla (Ayala et al., 2014).

Según FAO (2006), el mayor rendimiento del cultivo de pimentón se debe principalmente a la utilización de híbridos, mejoras en el riego y fertilización. Sin embargo, la aplicación de biofertilizantes en los cultivos puede considerarse una herramienta biotecnológica con beneficios tangibles que permitan mejorar el tiempo y porcentaje germinativo, además de promover el crecimiento de esta planta y reducir el uso de fertilizantes químicos. Por lo tanto, se evaluó el efecto de diferentes aislados bacterianos rizosféricos, nativos del estado Mérida, en la germinación y posterior crecimiento de plantas de pimentón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados bacterianos. Se evaluaron los siguientes aislados de la familia Rhizobiaceae: *Rhizobium tropici* (ME01), *Bradyrhizobium* sp. (Nod2R), *Sinorhizobium* sp. (RmB), *Sinorhizobium* sp. (Leu2A(1)2) más uno identificado sólo como PMG1. Junto a ellos se evaluó también una cepa del género *Azospirillum*, identificada como YAC1, la cual fue aislada del campo según se explica más adelante. La procedencia de estos aislados se señala en el Cuadro 1. Los rizobios,

conservados a 4 °C en tubos con medio agarizado con extracto de levadura-manitol-rojo congo (Elmarc), según Ferrera et al. (1993), modificado,

pertenecen a la colección del Laboratorio de Fitobiotecnología de la Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Cuadro 1. Procedencia de los aislados bacterianos estudiados (estado Mérida)

Cepas	Planta hospedera	Localidad	Referencia
<i>Rhizobium tropici</i> ME01	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	San Juan de Lagunilla	Marquina et al., 2011
<i>Sinorhizobium</i> sp. RmB	<i>Medicago sativa</i> L.	Jají	Marquina et al., 2011
<i>Bradyrhizobium</i> sp. Nod 2R	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. var. Tacarigua	El Vigía	Marquina et al., 2011
<i>Sinorhizobium</i> sp. Leu2A(1)2	<i>Leucaena</i> sp.	El Vigía	Marquina et al., 2011
PMG1 (rizobio no identificado)	<i>Gliricidia sepium</i>	San Juan de Lagunilla	Datos no publicados
<i>Azospirillum</i> sp. YAC1	<i>Saccharum officinarum</i> L.	Canaguá	Datos no publicados

Obtención del aislado de *Azospirillum* a partir de raíces de caña de azúcar. Las raíces de caña de azúcar extraídas con suelo rizosférico se guardaron en una bolsa plástica y se conservaron a 5 °C. Se seleccionaron las raíces más jóvenes, se lavaron con abundante agua corriente y se separaron en dos grupos, uno de ellos se desinfectó con hipoclorito de sodio 1 % por 60 segundos y se lavó repetidamente con agua destilada estéril (ADE). Las raíces fueron sumergidas en un buffer fosfato 0,05 M de pH 6,8 durante 30 minutos y lavadas con ADE. El otro grupo de raíces fue lavado solo con ADE y en cada caso, segmentos de 1 cm, fueron introducidos hasta el centro de los viales de 10 mL con 5 mL de medio semisólido libre de nitrógeno (NFb) modificado (Döbereiner y Day, 1976) e incubados a 30 °C hasta formarse una película blanquecina sub-superficial, característica del crecimiento de *Azospirillum*. De allí se tomaron muestras y cultivaron en el medio diferencial RC (Rodríguez, 1982) hasta obtener colonias aisladas y se verificó su pureza en medio agar-papa que permite el crecimiento de tanto hongos como bacterias.

Las colonias de *Azospirillum* fueron reconocidas por formar crestas en la superficie, lo cual permitió seleccionarlas libres de contaminantes y luego conservarlas en tubos con medio RC a 4 °C.

Cultivo de los aislados de rizobacterias. Para preparar los preinóculos utilizados en los ensayos, se tomaron muestras de los cinco aislados rizobianos y se cultivaron en medio agarizado Elmarc e incubaron a 30 °C hasta formar colonias blanquecinas y se transfirieron al mismo medio líquido modificado, sin RC. Igual procedimiento

se realizó para preparar el inóculo de *Azospirillum*, tomando colonias aisladas del medio agarizado RC y se prepararon los cultivos en caldo nutritivo (peptona, extracto de carne y NaCl) para evaluar la germinación y el crecimiento del pimentón. Para la prueba de producción de ácido indol 3-acético, los inóculos se prepararon en el medio Luria Bertani (LB) (Sambrook et al., 1989). Todos los cultivos se incubaron durante 2-5 días a 30 °C con agitación a 100 rpm.

Solubilización de fosfatos por los aislados de rizobacterias. Alícuotas de 800 µL de cultivos (10^8 UFC·mL⁻¹) de todos los aislados fueron centrifugadas a 14.000 rpm por 2 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en NaCl 0,8 % estéril.

Se efectuaron dos lavados y prepararon los inóculos bacterianos en la misma solución salina para luego ser sembradas por triplicado siete alícuotas (10 µL) de cada uno de los aislados en medio agarizado NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate) (Nautiyal, 1999), con 5 g·L⁻¹ de Ca₃(PO₄)₂. Igualmente, se ensayaron con fosfato de Fe⁺³ (5 g·L⁻¹), un compuesto también insoluble. Los cultivos fueron incubados a 30 °C durante 5 días y se registró el crecimiento de manera cualitativa con la formación de un halo transparente.

Germinación del pimentón inoculado con rizobacterias. Se emplearon semillas de pimentón var. Cacique Gigante con 98 % de viabilidad nominal pero que luego de dos años y medio de almacenamiento habían descendido su viabilidad a 75 %. Las mismas fueron lavadas con ADE hasta eliminar los restos de fungicida. Luego se embebieron en ADE, agitándolas a 100 rpm durante 20 min, y se desinfectaron con hipoclorito

de sodio 1,5 % por 15 min. Posteriormente, se lavaron repetidamente con ADE y se colocaron en cápsulas de Petri (10 semillas/cápsula) preparadas con dos círculos de papel de filtro separados por una capa de algodón, impregnados con ADE. Cada semilla se inoculó con 10 μL ($\sim 10^8$ UFC $\cdot\text{mL}^{-1}$) de los cultivos bacterianos, ME01, RmB, Nod2R, Leu2A(1)2, PMG1 y YAC1, más un control sin inocular.

Se estableció un diseño experimental completamente al azar con los siete tratamientos señalados y siete repeticiones para un total de 49 unidades experimentales. Cada unidad experimental constó de 10 semillas por cápsula de Petri. Éstas se mantuvieron en oscuridad a 28 °C y se efectuaron registros diarios para obtener la cinética de germinación.

Producción de AIA por las rizobacterias. Para determinar la producción de AIA se empleó el método modificado de Ahmad et al. (2005). Se realizó una curva de calibración empleando soluciones patrón (1 a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) permitiendo su reacción con 5 mL del reactivo de Salkowsky (50 mL ácido perclórico 35 % y 1 mL FeCl_3 0,5 M). Las reacciones se prepararon por triplicado. Luego se incubaron por 30 min a temperatura ambiente y se determinó la densidad óptica (DO) a 530 nm en un espectrofotómetro de luz visible (Spectronic 20).

Luego se seleccionaron los cuatro aislados que presentaron los porcentajes de germinación más altos y se cultivaron en medio LB, reduciendo la concentración de NaCl de 0,5 a 0,01 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, por la intolerancia a la salinidad de las cepas de rizobios. Las cepas de rizobios y *Azospirillum* se cultivaron previamente en medio LB, durante 2-5 días, hasta obtener cultivos densos (10^7 UFC $\cdot\text{mL}^{-1}$). Luego se transfirió 1 mL de los mismos a matraces que contenían medio LB (35 mL) suplementados con L-triptófano (Trp) 0,025; 0,05 ó 0,10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, más un control sin triptófano para cada cepa. Estos tratamientos se hicieron por triplicado (4 tratamientos por cepa x 4 cepas x 3 repeticiones, para un total de 48 unidades experimentales) y se incubaron en las mismas condiciones señaladas anteriormente, extrayendo cada cierto tiempo alícuotas de 5 mL para centrifugarlas a 3000 rpm por 30 min y tomar 2 mL de sobrenadante para mezclarlo con 4 mL de reactivo de Salkowsky. Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min y se determinó la DO a

530 nm en un Spectronic 20.

Evaluación *in vitro* de la promoción del crecimiento del pimentón. Para este ensayo fueron utilizadas suspensiones de tres cepas de bacterias pertenecientes a las familia Rhizobiaceae: ME01, Leu2A(1)2 y Nod2R (10^8 UFC $\cdot\text{mL}^{-1}$) crecidas en medio Elmarc (modificado) líquido y la cepa YAC1 del género *Azospirillum* (10^8 UFC $\cdot\text{mL}^{-1}$), cultivada en caldo nutritivo.

Las semillas desinfectadas, según el procedimiento antes señalado, germinaron en medio triptona-extracto de levadura (TY) (agar 0,8 %). Se tomaron entre 20 y 25 semillas germinadas e impregnaron con los diferentes cultivos bacterianos durante 30 min; las del control se colocaron en ADE. Al cabo de ese tiempo, se transfirió una semilla inoculada a frascos de vidrio de 500 mL que contenían 70 mL de las sales del medio Murashige y Skoog (MS), con gel Rite como soporte, con triptófano 0,05 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, o sin triptófano. Esta concentración fue seleccionada por haber permitido la mayor producción de AIA.

Se estableció un diseño experimental completamente al azar con 10 tratamientos y 10 repeticiones, para un total de 100 unidades experimentales. Cada una correspondió a una planta por frasco. Los tratamientos fueron organizados de la siguiente manera: dos tratamientos inoculados con cada cepa rizosférica (cuatro cepas), uno de ellos con triptófano y otro sin triptófano, y dos tratamientos control sin inocular con o sin el aminoácido.

Los envases fueron incubados en el cuarto de cultivo de plantas, a 25 °C y 16/8 horas luz/oscuridad. Transcurridos 55 días se desmontó el ensayo, se midió longitud de manera manual y determinó biomasa seca de vástago y raíz de cada una de las plantas, empleando una estufa de convección a 80 °C, hasta obtener peso seco constante. Se determinó el índice de efectividad de la inoculación en el crecimiento de las plantas de pimentón en presencia o ausencia del aminoácido $\text{IEI} = \frac{\text{Tratamiento inoculado} - \text{Control}}{\text{Control}} \times 100$ (Davies et al., 2005).

Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza y prueba de Duncan para los ensayos de germinación, producción de ácido indol-3 acético (AIA) y análisis de crecimiento, utilizando el programa SPSS v. 20.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de *Azospirillum*. Las colonias de bacterias del género *Azospirillum* crecieron abundantemente en el medio RC sin nitrógeno, después de su enriquecimiento en el medio NFb con ácido málico y condiciones microaerofílicas y se distinguieron por las características morfológicas típicas citadas por Rodríguez (1982): color rojo escarlata brillante, consistencia seca, diámetro 1,5-2 mm, forma circular o irregular, borde ondulado, superficie rugosa, con ondulaciones que irradian desde el centro.

Se demostró que los aislados rizosféricos de *Azospirillum* sp YAC1, extraídos de las raíces de caña de azúcar, se encontraban en el rizoplano (superficie radical) debido a que no se observó crecimiento en los viales que contenían el grupo de raíces desinfectadas con hipoclorito de sodio.

Solubilización de fosfatos de los aislados rizosféricos. Las bacterias rizosféricas ensayadas crecieron y formaron halo de solubilización en el medio NBRIP con fosfato tricálcico (Cuadro 2), pero no con el fosfato de Fe^{+3} . La formación del halo de solubilización del fosfato, y la eliminación de la turbidez alrededor de las colonias, se debe a la excreción por parte de las bacterias de ácidos orgánicos que acidifican el medio. Estos forman complejos con el ion Ca^{+2} , asociado con el fósforo insoluble, el cual se transforma en fosfato di y mono básicos solubles en agua, asimilable para las plantas, proceso que incrementa la fertilidad del suelo (Corrales et al., 2014). Se observa que la cepa Nod2R presentó el mayor diámetro de halo de disolución de fosfatos (15 mm) mientras que el aislado con menor halo fue YAC1 (8 mm).

Cuadro 2. Prueba de solubilización de fosfatos de los aislados rizosféricos estudiados

Cepas	ME01	Rm B	Leu 2A(1)2	Nod 2 R	PMG1	YAC1
Formación de halo	+	+	+	+	+	+
Diámetro del halo (mm)	9	10	12	15	12	8

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Peix et al. (2001) quienes estudiaron la solubilización de fosfatos de varios géneros del orden Rhizobiales y observaron que *Mesorhizobium mediterraneum* produjo un halo hasta 15 mm de diámetro en medio YED-P (extracto de levadura, glucosa, agar, suplementado con $Ca_3(PO_4)_2$

En otro trabajo Fernández et al. (2005) encontraron que 9 de las 10 cepas de la colección del INRA, pertenecientes al género *Bradyrhizobium*, formaron halos entre 5 y 12 mm. Por otra parte, Rodríguez y Fraga (1999), trabajaron con cepas de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Rhizobium*, entre otras, señalándolas, como las bacterias con mayor capacidad de solubilización de fosfatos. Reyes et al. (2008), utilizaron la prueba de disolución de fosfatos como un criterio para seleccionar cepas de diferentes rizobacterias como bioinoculantes de pimentón y maíz, utilizando tres fosfatos inorgánicos: Hidroxiapatita (HA), fosfato de hierro ($FePO_4$) y fosfato de aluminio ($AlPO_4$), observaron que 13 aislados disolvieron la HA, y de este grupo, cinco presentaron halos de solubilización de radio entre 1 y 3 mm, y ocho

aislados con radio menor a 1 mm después del borde de la colonia, mientras el resto de los aislados no mostraron una reacción visible. Sin embargo, *Azotobacter* sp. presentó halo de solubilización con los otros dos fosfatos.

La actividad solubilizadora de fosfato puede ser modificada por el intercambio de señales químicas entre los exudados radicales de la planta y las bacterias rizosféricas; tal es el caso, de la relación mutualista entre *Helianthus agnus jaegeri* y una rizobacteria, que solo logró disolver fosfatos en presencia de exudados de la planta (Goldstein et al., 1999).

Germinación de semillas de pimentón inoculadas con las rizobacterias. En el Cuadro 3 se observa que los mayores porcentajes de germinación se registraron en los tratamientos con Leu2A(1)2, YAC1 y Nod 2R con valores superiores a 97 % (grupo a); los tratamientos con los aislados PMG1, ME01 y RmB arrojaron porcentajes de germinación entre 88 y 92 % (grupo b), y en su totalidad fueron superiores ($P \leq 0,05$) al control, el cual sólo alcanzó 75,51 % (grupo c). Es decir, todas las cepas aumentaron el porcentaje de germinación de las semillas entre un 13 y 23 %.

La cinética de germinación (Figura 1) mostró que las semillas inoculadas con las diferentes cepas alcanzaron el máximo germinativo al tercer día, acelerando la germinación en 24 horas con relación al control sin inocular. Reyes et al. (2008) observaron incrementos cercanos al 10 % en la germinación de semillas de pimentón inoculadas

con diferentes cepas bacterianas, entre ellas unas pertenecientes a los géneros *Azospirillum* y *Rhizobium*, resultados que son congruentes con los registrados en nuestro trabajo. De igual manera, Santillana et al. (2005) encontraron aumentos de 20 % de germinación en semillas de tomate inoculadas con diversas cepas de rizobios.

Cuadro 3. Efecto de la inoculación de rizobacterias en el porcentaje de germinación de semillas de pimentón var. Cacique Gigante

Cepas	Control	PMG1	RmB	ME01	Leu2A(1)2	YAC1	Nod2R
Germinación (%)	75,51 c	88,57 b	91,14 b	91,14 b	97,14 a	97,14 a	98,57a

Valores con las mismas letras no presentan diferencias significativas entre sí según la prueba de Duncan ($P \leq 0,01$)

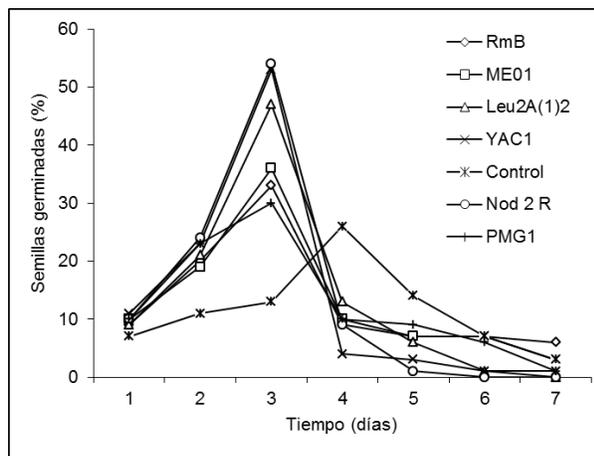


Figura 1. Cinética germinativa de semillas de pimentón inoculadas con las cepas RmB, ME01, Leu2A(1)2, YAC1, PMG1 y Nod2R. Control sin inocular

Ayala et al. (2014) encontraron que las semillas que germinan en menor tiempo son más homogéneas y vigorosas, por lo que sugieren que una germinación lenta y con mayor dispersión en el tiempo produce plántulas heterogéneas, pequeñas y menos vigorosas. Señalan que en su madurez, la semilla logra el completo desarrollo morfológico y fisiológico del embrión, y finaliza la acumulación de reservas, fase en la que se expresa su máxima germinación y vigor, y luego comienza su deterioro.

Las semillas de pimentón, se pueden considerar quiescentes, ya que son capaces de germinar cuando se les suministra agua y condiciones adecuadas de temperatura y aireación (Bewley y Baker, 1994). En este sentido, al cabo de 2 años y medio después de la fecha de empaque

de las semillas de pimentón empleadas en nuestro estudio y etiquetadas con un porcentaje de viabilidad del 98 %, la germinación descendió aproximadamente al 75 % (Cuadro 3), lo cual se atribuye al tiempo de almacenamiento. Sin embargo, es apreciable que bajo estas circunstancias se logró ver los efectos promotores de las bacterias rizosféricas inoculadas. Lo anterior es menos evidente cuando se emplean semillas de otras Solanáceas, tales como híbridos de pimentón y variedades de tomate recién empacadas con altos porcentajes de viabilidad (datos no mostrados). El efecto promotor en la germinación parece indicar que las hormonas excretadas por las bacterias rizosféricas juegan un papel importante en el alargamiento celular del eje embrionario-radícula, acompañado o no por divisiones celulares, donde la auxina podría ser una de las principales hormonas involucradas ya que entre sus funciones se señala el aumento de la extensibilidad de la pared celular, relacionada con la actividad de las enzimas transglucosilasa (*XET*) y expansinas (Bewley, 1997).

Diferentes estudios evidencian la participación de las fitohormonas, especialmente la auxina en la estimulación del proceso de germinación en semillas que han iniciado el proceso de deterioro o envejecimiento, tal como se aprecia en una investigación realizada por Eisvand et al. (2010), quienes encontraron que el tratamiento hormonal mejoró el porcentaje y tasa de germinación de semillas de *Agropyron elongatum* deterioradas en condiciones de sequía controlada. Así, la aplicación de 50 ppm de auxina aumentaron la germinación de las semillas, envejecidas naturalmente, en un 18 %. También demostraron

que estas semillas tratadas con hormonas fueron más efectivas en incrementar la actividad de enzimas antioxidantes (catalasa, glutatión reductasa y peroxidasa, superóxido dismutasa). Las especies oxígeno reactivas (ROS) y antioxidantes, junto con las fitohormonas juegan un papel fundamental en la regulación del desarrollo y maduración de las semillas, germinación, latencia y establecimiento de las plántulas (Bailly y Kraner, 2011).

En este sentido, se ha evidenciado el papel esencial de las fitohormonas en promover la germinación, relacionados con su interdependencia con el metabolismo de especies de oxígeno reactivas (ROS), e involucradas en la activación en cascada de la proteína quinasa mitógeno activada, expresión de genes y modificaciones post-transcripcional de proteínas (Díaz et al., 2013). En girasol, la auxina regula el desarrollo de la semilla y aumenta su longevidad por modular la estabilidad de la proteína HAIAA27 Aux/AIA, la cual interactúa con el factor de transcripción HAHSFA9 que media su represión (Carranco et al., 2010).

Es importante destacar que las semillas, en este caso de pimentón, que han reducido su viabilidad por cierto grado de deterioro o envejecimiento celular, pueden incrementar su porcentaje de germinación al ser inoculadas con rizobacterias promotoras de crecimiento, que tienen la capacidad de sintetizar y excretar fitohormonas, particularmente la auxina, aparte de otros beneficios que puede brindarle a la planta. Por esta razón, es importante para un productor la aplicación de esta herramienta biotecnológica que le ofrece beneficios desde el punto de vista económico y sustentable, menos contaminante, pues incrementa el número de plántulas para el establecimiento, que puede significar mayor población de plantas y subsecuente mayor capacidad productiva.

Producción de AIA por las bacterias rizosféricas. La producción de AIA en los cuatro aislados con los mejores resultados en el ensayo de germinación, es decir, *Bradyrhizobium* sp. Nod2R, *Azospirillum* sp. YAC1, *Sinorhizobium* sp. Leu2A(1)2 y *R. tropici* ME01 (Cuadro 3), con diferentes concentraciones de Trp, mostraron un patrón sigmoidal similar al control, que tendió a estabilizarse o disminuir, según la cepa. El aislado de *Azospirillum* YAC1 fue el mayor productor de

AIA, con 17,9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, registrado a las 40 h en presencia de 0,05 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Trp (Figura 2a), seguida por la cepa Leu 2A(1)2 (Figura 2b), con 6,45 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a las 48 h, la cepa Nod 2R con 6,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ también a las 48 h (Figura 2c) y el aislado ME01 (5,85 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) a las 20 h (Figura 2d). Este comportamiento probablemente esté relacionado con las condiciones metabólicas y del crecimiento particular de cada cepa bacteriana en ese medio de cultivo.

Al final de la prueba se encontró que la adición de Trp al medio LB indujo mayor producción de AIA ($P\leq 0,05$) en todos los aislados, con tendencia a incrementarse con las dosis mayores, a excepción de ME01 suplementado con 0,025 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Trp, el cual no mostró diferencias significativas respecto al control (Cuadro 4). Esto último podría sugerir que estas bacterias rizosféricas poseen otra ruta alternativa para la síntesis de AIA independiente del Trp, tal como ha sido señalado por Costacurta y Vanderleyden (1995) para *Azospirillum*, el cual posee además, la vía biosintética del ácido indol-3-piruvico dependiente del Trp que es de mayor significancia, igual ocurre en las bacterias simbióticas del género *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Se destaca, además, el hecho que todos los aislados pueden producir AIA aun en ausencia de triptófano (Cuadro 4. Figura 2).

Cuadro 4. Producción de AIA por rizobacterias promotoras de crecimiento

Cepas	Tratamientos con triptófano ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)			
	Control	0,025	0,05	0,1
Leu2A(1)2	4,2067a	5,5633b	5,7833b	5,9700b
ME01	3,3500a	4,0133a	5,5933b	5,8067b
Nod2R	4,0600a	5,6200b	5,6500b	5,7500b
YAC1	9,7167a	12,0100b	15,6467c	16,8367c

Valores con las mismas letras no presentan diferencias significativas, según la prueba de Duncan ($P\leq 0,05$)

Los reportes señalados en la literatura pertinente indican que los resultados en este tipo de investigaciones varían con la especie de microorganismo así como con las condiciones fisicoquímicas, nutricionales y ambientales donde se haya desarrollado el estudio.

En el caso del trabajo realizado por Zakharova et al. (1999), se obtuvo de igual manera un patrón sigmoidal en la gráfica de producción de AIA en

A. brasilense; sin embargo, la máxima producción de AIA fue muy elevada ($15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y alcanzada a los 3 días con $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Trp, una concentración mil veces más alta que la mayor concentración utilizada en este estudio. Por otra parte, Pazos et al. (2000) estudiaron 12 cepas de *Azospirillum* sp. y consideraron baja la producción de AIA ($10\text{-}33 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), pero niveles efectivos en la promoción del crecimiento, ya que esta

fitohormona actúa a bajas concentraciones en el metabolismo de la planta. Pedraza et al. (2004), en su estudio con bacterias asociativas fijadoras de nitrógeno, coinciden en señalar a las cepas de *Azospirillum lipoferum* y *A. brasilense*, como buenas productoras de AIA, utilizando triptófano como precursor, ya que pudieron generar altas concentraciones de AIA (16 a $38 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$).

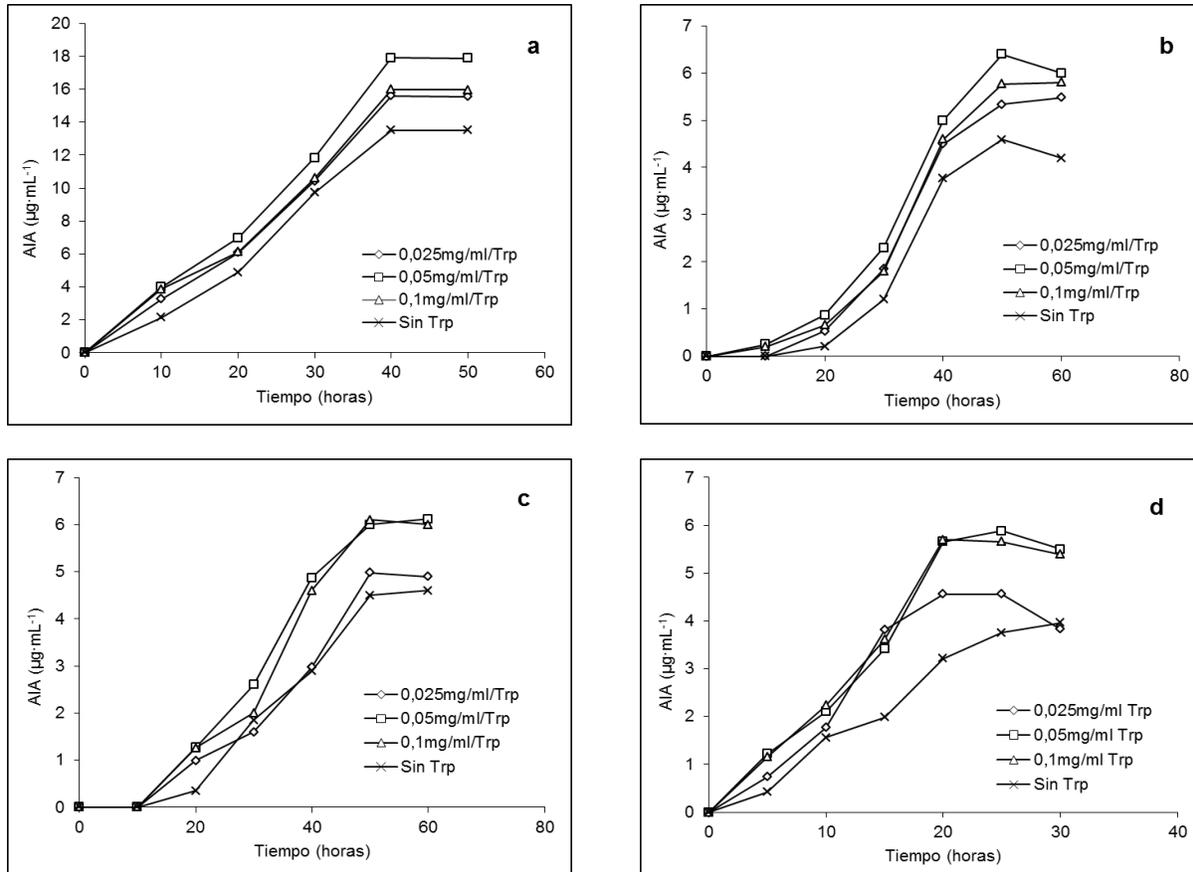


Figura 2. Producción de AIA por los aislados rizoféricos: (a) *Azospirillum* sp. YAC1, (b) Leu2A(1)2, (c) Nod2R, y (d) ME01, crecidos en medio LB suplementado con L-triptófano ($0,025$; $0,05$ y $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)

De igual manera, se ha logrado determinar producción de altas concentraciones de AIA ($99,7 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) en presencia de triptófano por una cepa de *Rhizobium* sp. aislado de nódulos de *Cajanus cajan* (Chaya y Basu, 2000), y en aislados rizobianos de *Trebol pratense* TPV08 y *Phaseolus vulgaris* PETP01 (García et al., 2012).

Crecimiento *in vitro* del pimentón. Los resultados mostrados en la Figura 3 demuestran que la inoculación de las semillas de pimentón con

los aislados rizoféricos YAC1 y Leu2A(1)2, en ausencia de triptófano, se destacaron como los inoculantes que causaron un efecto positivo ($P\leq 0,05$) en la longitud de la parte aérea y radical, y de la biomasa seca de la raíz (Figura 4), a diferencia de los aislados ME01 y Nod2R que arrojaron valores muy similares al control ($P>0,05$).

Además, es evidente que la presencia de L-triptófano estimuló aun más el efecto promotor

del crecimiento por las rizobacterias YAC1 y Leu2A(1)2, resultando en un incremento ($P \leq 0,05$) en longitud y biomasa seca del vástago y raíz, respecto al control (Figuras 4 y 5). También se observó que las plantas inoculadas con ME01 en presencia del aminoácido mostraron el efecto estimulador en la longitud del vástago y raíz.

Índice de efectividad del inóculo (IEI) en

plantas de pimentón. Las plantas de pimentón suplementadas con triptófano e inoculadas con los aislados rizosféricos *Rhizobium tropici* ME01, *Azospirillum* sp. YAC1 y *Sinorhizobium* sp. Leu2A(1)2 presentaron valores porcentuales del IEI más elevados en todos los parámetros evaluados (longitud y peso seco de vástago y raíz) que los registrados en ausencia del aminoácido (Cuadro 5).

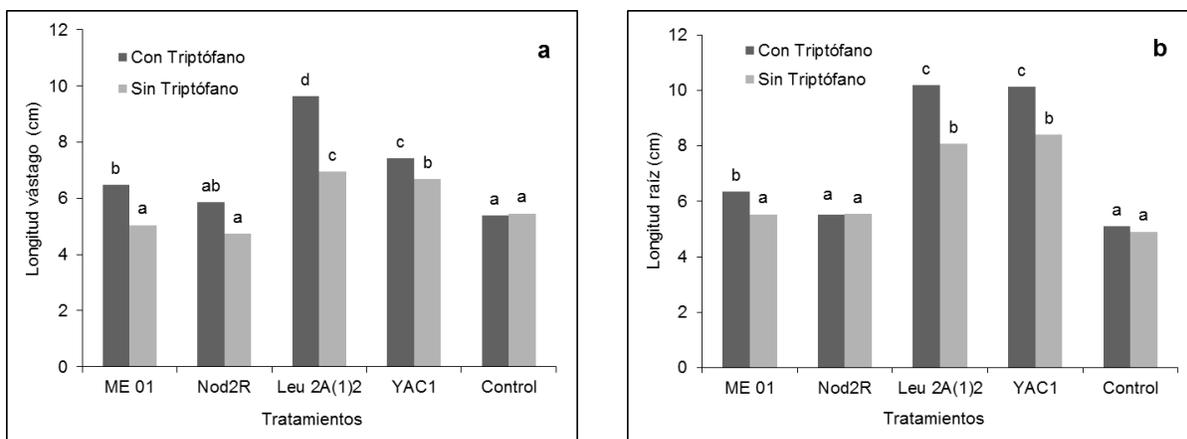


Figura 3. Longitud promedio de vástago (a) y raíz (b) de plantas de pimentón inoculadas con cuatro rizobacterias en presencia o ausencia de L-triptófano. Letras iguales al control significan ausencia de diferencias significativas según la prueba de Duncan ($P \leq 0,05$)

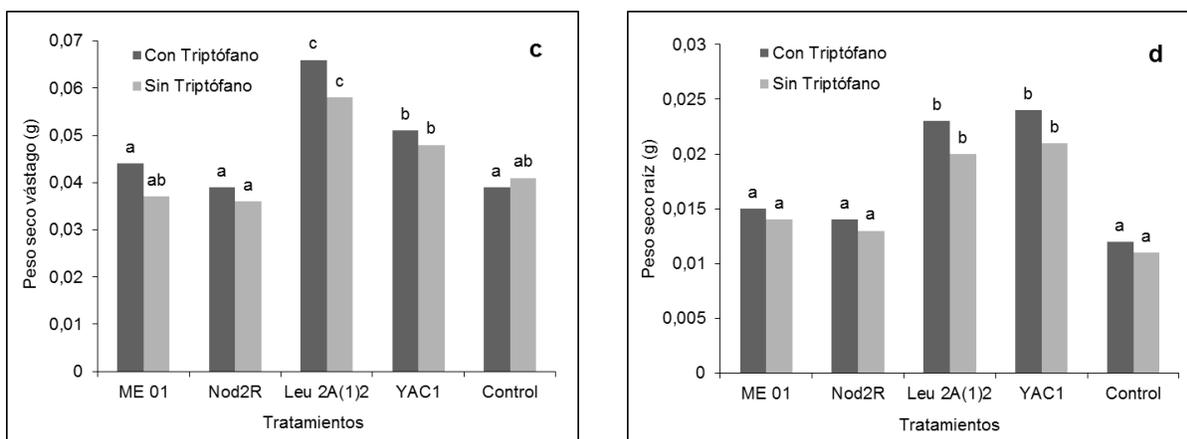


Figura 4. Peso seco promedio del vástago (a) y raíz (b) de plantas de pimentón inoculadas con cuatro rizobacterias en presencia y ausencia de L-triptófano. Letras iguales al control significan ausencia de diferencias significativas según la prueba de Duncan ($P \leq 0,05$)

Se destaca, especialmente en plantas tratadas con YAC1 y Leu 2A(1)2, la efectividad de la inoculación en presencia de Trp, por estimular el crecimiento de la parte radical con incrementos porcentuales en longitud y peso seco de 36,4 y 50,0 %, respectivamente, para el tratamiento con YAC1, y 47,6 y 58,4 %, respectivamente, para

Leu2A(1)2. Además, se observó el efecto promotor del crecimiento en la parte aérea, con incrementos en longitud de 10,6 % y de 16,4 % en el peso seco 16,4 % en las plantas inoculadas con YAC1.

Para el tratamiento Leu2A(1)2 se registraron incrementos de 30,1 % en la longitud del vástago

y 31,0 % en su peso seco, lo que indica que este fue el aislado rizosférico más efectivo en promover el crecimiento de las partes aérea y radical de las plantas de pimentón. Sin embargo, el efecto estimulador por parte del triptófano no fue observado en la longitud y peso seco del vástago de las plantas tratadas con el aislado *Bradyrhizobium* sp. Nod2R. Estos resultados demuestran que la inoculación fue efectiva y el papel del triptófano fue determinante en el aumento de longitud de raíces y vástagos, siendo la excepción las plantas tratadas con Nod2R las cuales presentaron un crecimiento en longitud similar al control tanto en presencia como en ausencia del aminoácido.

Es conocido que el triptófano como precursor de la ruta biosintética del ácido indol acético,

incrementa la producción de esta hormona, la cual promueve la síntesis de etileno que es inhibidor del crecimiento del vástago y raíz (Taiz y Zeiger, 2010), pero la presencia de la enzima ACC desaminasa puede catalizar la oxidación del etileno en amonio y α -cetobutirato con lo cual se logra reducir las concentraciones de este inhibidor. Existe la posibilidad de que la cepa Nod2R no posea actividad de la enzima ACC desaminasa.

La presencia de esta enzima en algunas rizobacterias promotoras del crecimiento se considera de gran importancia biotecnológica para mejorar la producción agrícola, por contrarrestar los efectos inhibitorios del etileno en el crecimiento del vástago y raíz de las plantas (Esquivel et al., 2013).

Cuadro 5. Índice de Efectividad de la Inoculación (IEI) en el crecimiento de plantas de pimentón, cultivadas en presencia o ausencia de triptófano

Cepas	Sin triptófano				Con triptófano (0,05 mg·mL ⁻¹)			
	Long V (%)	Long R (cm)	P.S.V (%)	P.S.R (%)	Long V (%)	Long R (%)	P.S.V (%)	P.S.R (%)
ME01	10,4	17,8	10,6	16,6	22,0	41,5	26,3	41,6
Nod2R	13,6	18,0	13,5	16,6	3,2	24,4	6,9	25,0
Leu2A(1)2	40,2	71,8	40,6	66,6	70,3	119,4	71,7	125,0
YAC1	18,3	79,0	16,9	75,0	28,9	115,4	33,3	125,0
Control	-	-	-	-	-	-	-	-

Long V: longitud del vástago, Long R: longitud de la raíz, PSV: peso seco del vástago, PSR: peso seco de raíz, IEI= 100 (Tratamiento inoculado - Control)/Control

Es importante señalar que las plantas tratadas con las rizobacterias YAC1 y Leu2A(1)2, presentaron una gran cantidad de raíces laterales y pelos radicales e incluso raíces adventicias en el eje hipocótilo-raíz. Estas dos cepas sintetizaron las mayores concentraciones de AIA, así que muchas de las respuestas atribuidas a su actividad pueden ser mediadas por el etileno producido en respuesta a la auxina. Se conoce que las auxinas inhiben el crecimiento de la raíz principal en altas concentraciones, pero estimulan la formación de raíces laterales y adventicias las cuales mejoran la absorción de agua y minerales (Taiz y Zeiger, 2010).

En experimentos realizados con *Sesbania aculeata* y *Vigna radiata* por Ahmad et al. (2005), y los realizados por Rojas et al. (2010) en *Cynodon dactylon*, evidenciaron que entre los factores que condicionan la promoción del

crecimiento de plantas tratadas con rizobacterias se encuentra las concentraciones de AIA secretada por la bacteria al medio, las concentraciones endógenas de la planta y la especie de rizobacteria inoculada.

Cabe destacar que los resultados anteriores son atribuidos a la producción de AIA favorecida por la presencia de L-triptófano en el medio, que induce la división y alargamiento celular, es decir, el incremento del crecimiento de las plantas (Hassan y Bano, 2015). Tsavkelova et al. (2006) mencionan que este tipo de auxinas estimula tanto el crecimiento vegetal como el desarrollo de las poblaciones microbianas.

El efecto promotor del crecimiento vegetal generado por las rizobacterias ha sido demostrado en *Azospirillum*, como resultado de la producción de AIA, la auxina más importante secretada por esta bacteria, por promover el desarrollo de las

raíces laterales y las divisiones del meristema apical, que contribuyen a incrementar la longitud y biomasa de las raíces (Dobbelaere et al., 2003). Así mismo, (Malhotra y Srivastava, 2006; 2009) trabajaron con la cepa de *Azospirillum brasilense* y evidenciaron que el suministro exógeno de triptófano favorecía directamente el incremento de la concentración de AIA. Además, destacaron que en un ambiente natural, se ha detectado que éste aminoácido es un componente de los exudados radicales liberados por las plantas hospederas, a las cuales están asociadas las bacterias (Malhotra y Srivastava, 2006). Por ello, las plantas y los microorganismos pueden regular la síntesis y liberación del AIA en la rizósfera, que se puede traducir en un mejoramiento del crecimiento (Dobbelaere et al., 2003).

Numerosos estudios han demostrado el uso de rizobios como bacterias promotoras del crecimiento de las plantas no leguminosas (Antoun, 2001). En plantas de maíz inoculadas con *R. etli* se ha registrado incrementos de 42% y 49% en la materia seca de la parte aérea y radical, respectivamente (Gutiérrez y Martínez, 2001). Estas asociaciones entre rizobios y plantas no leguminosas pueden mejorar el crecimiento vegetal, aunque no se haya demostrado que sea mediante la fijación de nitrógeno (García et al., 2012).

CONCLUSIONES

Los seis aislados rizosféricos evaluados, todos nativos del estado Mérida, Venezuela, aumentaron el porcentaje de germinación de las semillas de pimentón var. Cacique Gigante, con incrementos de hasta 23 %. La cepa Nod2R arrojó el mejor resultado. Además, las rizobacterias aceleraron la máxima germinación en relación al control, e indujeron plántulas más homogéneas y vigorosas.

Las rizobacterias de los géneros *Sinorhizobium* sp Leu2A(1)2, *Rhizobium tropici* ME01, *Bradyrhizobium* sp. Nod2R y *Azospirillum* sp. YAC1 son productoras de AIA, cuya concentración aumentó en presencia de L-triptófano (0,05 mg.mL⁻¹). La producción más alta fue registrada con *Azospirillum* sp. (17,9 µg.mL⁻¹). Todos los aislados de rizobacterias mostraron la capacidad de solubilizar fosfato tricálcico, pero no fosfato de hierro.

Los aislados Leu2A(1)2, YAC1 y ME01

estimularon el crecimiento en longitud del vástago y raíz. Los dos primeros también lo hicieron con relación al peso seco, todos estimulados por el triptófano. El mejor resultado se obtuvo en las plantas de pimentón inoculadas con Leu2A(1)2, las cuales incrementaron 30 y 31 % la longitud y peso seco del vástago, respectivamente, y 47,6 en la longitud y 58,4 % en el peso seco de la parte radical. Por lo tanto esta rizobacteria podría ser considerada como un inoculante promisorio para este rubro hortícola.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes CDCHTA de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela, por financiar este trabajo (código C-1928-15-01-B). Al Ingeniero José Rogelio Márquez Pernía, por colaborar en el análisis estadístico.

LITERATURA CITADA

1. Achari, G. y R. Ramesh. 2014. Diversity, biocontrol, and plant growth promoting abilities of xylem residing bacteria from solanaceous crops. Int. J. Microbiol. 14 p. Article ID 296521
2. Ahmad, F., I. Ahmad y M. Khan. 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolated of *Azotobacter* and *Pseudomonas fluorescent* in the presence and absence of tryptophan. Turk. J. Biol. 29: 29-34.
3. Antoun, H. 2001. PGPR activity of *Rhizobium* with non leguminous plants. J. Plant Physiol. 28: 45- 870.
4. Ayala-Villegas, M., O. Ayala-Garay, V. Aguilar-Rincón y T. Corona-Torres. 2014. Evolución de la calidad de semillas de *Capsicum annuum* L. durante su desarrollo en el fruto. Revista Fitotécnica Mexicana 37(1): 79-87.
5. Bailly C. y I. Kraner. 2011. Analyses of reactive oxygen species and antioxidants in relation to seed longevity and germination. Methods Mol. Biol. 773: 343-67.
6. Barreto-Figueiredo, M., A. Bonifacio, A. Cerqueira-Rodríguez y F. De Araujo. 2016. Plant growth-promoting rizobacteria: Key

- mecanismos de acción. *In*: Choudhary y Varma (eds.). *Microbial Mediated Induced Systemic Resistance in Plants*. Springer Science, Singapore. pp. 23-37.
7. Bewley, J. y M. Baker. 1994. Physiology of development and germination. *In*: *Seeds*. Spriger Science. New York. p. 421.
 8. Bewley, J. 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, 9:1055-1066.
 9. Camelo, M., M. Vera y B. Bonilla. 2011. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 12(2): 159-166.
 10. Carranco, R., J. Espinosa, P. Prieto-Dapena, C. Almoguera y J. Jordano. 2010. Repression by an auxin/indole acetic acid protein connects auxin signaling with heat shock factor-mediate seed longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107(50): 21908-13
 11. Chaya, D. y P. Basu. 2000. Indole acetic acid production by a *Rhizobium* species from root nodules of a leguminous shrub, *Cajanus cajan*. *Microbiological Research* 155(2):127-130.
 12. Corrales-Ramírez, L., Z. Arévalo-Galvez y V. Moreno-Burbano. 2014. Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *Revista Nova* 12(21): 67-79.
 13. Costacurta, A. y J. Vanderleyden. 1995. Synthesis of Phytohormones by plant associated bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*. 21(1): 1-18.
 14. Davies, F., C. Calderón y Z. Huamán. 2005. Influence of Arbuscular Mycorrhizae indigenous to Peru and a flavonoid on growth, yield and leaf elemental concentration of “Yungay” Potatoes. *Hort Science*. 40(2): 381-385.
 15. Díaz-Vivancos, P., G. Barba-Espín y J. Hernández. 2013. Elucidating hormonal/ROS networks during seed germination: insights and perspectives. *Plant Cell Rep*. 32:1491-1502.
 16. Di Barbaro, G., S. Pernasetti y A. Stegmayer. 2005. Evaluación del efecto de *Azospirillum brasilense* en la germinación y emergencia del pimiento pimentonero (*Capsicum annuum* L. var. Trompa de elefante). *Revista del Cizas* 6(1-2): 74-85.
 17. Dobbelaere, S., J. Vanderleyden y Y. Okon. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 22:107-149
 18. Döbereiner, J. y J. Day. 1976. Associative Symbiosis in Tropical Grasses. Characterization of Microorganism and Dinitrogen Fixing Sites. *In*: W. Newton y C. Nyman (eds.). *Proceedings of the First International Symposium on Nitrogen Fixation* Washington State University Press, Pullman. pp. 518-538.
 19. Eisvand, H., R. Tavakkol-Afshari, F. Sharifzadeh, H. Maddah Arefi y S. Hesamzadeh Hejazi. 2010. Effects of hormonal priming and drought stress on activity and isozyme profiles of antioxidant enzymes in deteriorated seed of tall wheatgrass (*Agropyron elongatum* Host). *Seed Science and Technology* 38(2): 280-297.
 20. Esquivel-Cote, R. Gavilanes-Ruiz, M. Cruz-Ortega, R. y P. Huante. 2013. Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias, una revisión. *Fitotecnia Mexicana* 36(3): 251-258.
 21. FAO (Food and Agriculture Organization). 2006. Datos agrícolas de FAOSTAT. Índices de producción. <http://faostat.fao.org/faostat/> (consulta del 04/11/2015).
 22. Fernández, L., P. Zalba y M. Gómez. 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de la región sojera. *Cienc. Suelo*. 23(1): 31-37.
 23. Ferrera-Cerrato, R., M. González y M. Rodríguez. 1993. *Manual de Agromicrobiología*. Editorial Trillas. México. 139 pp.
 24. García-Fraile, P., L. Carro, M. Robledo, M. Ramírez-Bahena, J. Flores-Félix, M. Fernández et al. 2012. *Rhizobium* promotes non-legumes growth and quality in several production steps: Towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. *PLoS One* 7(5): e38122.
 25. Goldstein, A., H., K. Braverman y N. Osorio. 1999. Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limited desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) rhizobacterium. *FEMS*

- Microbiology Ecology 30: 295-300.
26. Gutiérrez-Zamora, M. y E. Martínez-Romero. 2001. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays*). J. Biotech. 91: 117-126.
 27. Hassan, T. y A. Bano. 2015. The stimulatory effects of L-tryptophan and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on soil health and physiology of wheat. J. Soil Sci. Plant Nutr. 15(1): 190-201.
 28. Kloepper, J., M. Shroth y T. Miller. 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant Growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. Phytopathology 70: 1078-1082.
 29. Luna-Martínez, L., R. Martínez-Peniche, M. Hernández-Iturriaga, S. Arvizi-Medrano y J. Pacheco-Aguilar. 2013. Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. Revista Fiotécnica Mexicana 36(1): 63-69.
 30. Malhotra, M. y S. Srivastava. 2006. Targeted engineering of *Azospirillum brasilense* SM with indole acetamide pathway for IAA over-expression. Can. J. Microbiol. 52(11): 1078-1084.
 34. Malhotra, M. y S. Srivastava. 2009. Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. Eur. J. Soil Biol. 45: 73-80.
 31. Marquina, M., N. González y Y. Castro. 2011. Caracterización Fenotípica y genotípica de doce rizobios aislados de diversas regiones de Venezuela. Biología Tropical 59(3): 1017-1039.
 32. Nautiyal, C. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiol. Lett. 170:265-270.
 33. Pazos, M., A. Hernández, V. Paneque y J. Santander. 2000. Caracterización de cepas del género *Azospirillum* aisladas de dos tipos de suelos de la localidad de San Nicolás de Bari. Cultivos Tropicales (CU) 21(3): 19-23.
 34. Pedraza, R., A. Ramírez-Mata, M. Xiqui y B. Baca. 2004. Aromatic amino acid aminotransferase and activity índole-3-acetic acid production by associative nitrogen fixing bacteria. Microbiology Letters 233: 15-21.
 35. Peix, A., B. Rivas, P. Mateos, C. Rodríguez, E. Martínez, y H. Velásquez. 2001. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilising strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. Soil Biol. Biochem. 33: 103-110.
 36. Reyes, I., A. Luimar, E. Hind y V. Alexis. 2008. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. Bioagro 20(1): 37-48.
 37. Rivera-Alegría, M. 2014. Evaluación a la respuesta del pimiento (*Capsicum annum* L.) var. Cannon y del pepino (*Cucumis sativa* L.) var. Primavera a la inoculación con rizobacterias. Tesis. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. 94 p.
 38. Rodríguez-Cáceres, E. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* ssp. Appl. Environ. Microbiol. 44(4): 990-991.
 39. Rodríguez, H. y R. Fraga. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances 17 (4-5): 319-339.
 40. Rojas, A., A. Rodríguez, S. Montes, S. Pérez, A. Rodríguez y A. Guerrero. 2010. Evaluación de la promoción del crecimiento de *Cynodon dactylon* L. por rizobacterias productoras de fitohormonas aisladas de un suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. Polibotánica 29: 131-147.
 41. Sambrook, J., E. Fritsch y T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Second edition. Volumes 1, 2 and 3. Current protocols in molecular biology. Volumes 1 and 2. Cold Spring Harbor, New York. 1626 p.
 42. Santillana, N., C. Arellano y D. Zuñiga. 2005. Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). Ecología Aplicada 4(1,2): 47-51.
 43. Taiz, L. y E. Zeiger. 2010. Plant Physiology, 5th Ed. Sinauer Sunderland
 44. Tsavkelova, E., S. Klimova, T. Cherdyntseva y A. Netrusov. 2006. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. Appl. Biochem. Microbiol. 42:

117-126.

45. Vazallo, S., L. Ramírez, L. Carranza, B. García y B. Bernilla. 2013. Efecto de la inoculación de *Rhizobium etli* y *Trichoderma viride* sobre el crecimiento aéreo y radicular de *Capsicum annuum* var. Longum. Rebiolest

1(1): 11-21

46. Zakharova, E., A. Alexander, V. Shcherbakov, V. Brudnik, G. Nataliya, S. Skripko, B. Bulkhin y V. Ignatov. 1999. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. Eur. J. Biochem. 259(3): 572-576.