



CIENCIAS AGRARIAS Y DE LA PESCA

Artículo original de investigación

Contribución al conocimiento de la interacción *Rhizobium*-arroz (*Oryza sativa* L.). Oportunidades para la biofertilización del cultivo

Ionel Hernández Forte ^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-5760-816X>

María Caridad Nápoles García ¹ <https://orcid.org/0000-0003-1413-1717>

Lázaro Alberto Maqueira López ² <https://orcid.org/0000-0001-6759-0314>

Federico Battistoni Urrutia ³ <https://orcid.org/0000-0002-5648-1304>

¹ Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Mayabeque, Cuba

² Unidad Científica Tecnológica de Base Los Palacios. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Pinar del Río, Cuba

³ Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Montevideo, Uruguay

*Autor para la correspondencia: ionel.hdez09@gmail.com

Revisores ^a

Editor

Lisset González Navarro
Academia de Ciencias de Cuba. La
Habana, Cuba

Traductor

Darwin A. Arduengo García
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

RESUMEN

Introducción: El desarrollo de bioproductos para beneficiar cultivos de importancia económica como el arroz tributa directamente a nuestra soberanía alimentaria. El objetivo del trabajo fue obtener y caracterizar cepas bacterianas asociadas a 2 cultivares de arroz de amplia distribución en Cuba, en cuanto a sus potencialidades como bacterias promotoras del crecimiento vegetal. **Métodos:** Se realizó el aislamiento de bacterias asociadas a la rizosfera y semillas de los cultivares de arroz INCA LP-5 e INCA LP-7 y se identificaron por secuenciación parcial del ARNr 16S. Las cepas se caracterizaron en cuanto a potencialidades como biofertilizantes, fitoestimulantes, de biocontrol y atributos de infección y colonización. Se estudió la capacidad endofítica de una cepa de *Rhizobium* en plántulas de arroz, a partir de ensayos de inoculación y microscopía confocal de fluorescencia. Se desarrollaron experimentos de inoculación en condiciones controladas, semicontroladas y de campo. **Resultados:** Se aislaron 43 cepas; 24 de la rizosfera y 19 del interior de semillas de arroz y se identificaron 8 géneros bacterianos asociados: *Rhizobium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Mitsuraria*, *Enterobacter*, *Bacillus* y *Paenibacillus*. Algunas cepas solubilizaron fosfato de calcio y potasio, crecieron en medios libres de nitrógeno y produjeron sideróforos, compuestos indólicos, enzimas hidrolíticas y formaron biopelículas. Se comprobó la capacidad endofítica de una cepa de *Rhizobium* y su colonización sistémica en plántulas de arroz. La inoculación de algunas cepas incrementó el contenido de nutrientes, algunas biomoléculas y el crecimiento de plantas de arroz. Además, el rendimiento del cultivo se favoreció entre 30 % y 80 %, con

^a N. del E: En este apartado figuran los nombres de los árbitros que accedieron a revelar su identidad, como expresión de apertura progresiva del proceso de revisión por pares. No aparecen aquellos que optaron por el anonimato.

la reducción del 40 % a 60 % de la fertilización nitrogenada. Conclusiones, la investigación constituye un aporte al conocimiento de la interacción *Rhizobium*-arroz y a la identificación, caracterización y selección de cepas bacterianas con potencialidades para el desarrollo de bioproductos que impacten positivamente en el medio ambiente, la economía y la sociedad.

Palabras clave: rizobios; bacterias promotoras del crecimiento vegetal; gramínea; crecimiento, endófitos

Contribution to the knowledge of interaction *Rhizobium*-rice (*Oryza sativa* L.). Opportunities for crop biofertilization

ABSTRACT

Introduction: Bioproduct development to benefit economic importance crops such as rice, contributes directly to our food sovereignty. The objective of the work was: To obtain and characterize bacterial strains associated with two rice cultivars widely distributed in Cuba, in terms of their potential as Plant Growth Promoting Bacteria. **Methods:** It was performed the isolation of bacteria associated to the rhizosphere and seeds of INCA LP-5 and INCA LP-7 rice cultivars and they were identified by partial 16S rRNA sequencing. The strains were characterized according to their potentiality as biofertilizers, phyto stimulants, biocontrol and attributes of infection and colonization. It was studied in rice seedlings the endophytic capacity of a *Rhizobium* strain, starting from inoculation tests and using confocal fluorescence microscopy. Inoculation experiments were carried out under controlled, semi-controlled and field conditions. **Results:** Were isolated 43 strains; 24 from the rhizosphere and 19 from rice seeds and eight associated bacterial genera were identified: *Rhizobium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Mitsuaria*, *Enterobacter*, *Bacillus* and *Paenibacillus*. Some strains solubilized calcium and potassium phosphate, grew in nitrogen-free media, and produced siderophores, indole compounds, hydrolytic enzymes and formed biofilms. It was verified the endophytic capacity of a *Rhizobium* strain by systemic colonization of rice seedlings. The inoculation of some strains increased the content of nutrients, some biomolecules and rice plant growth. Furthermore, the crop yield enhanced between 30% - 80% with reduction of 40%-60% of nitrogen fertilization. **Conclusions:** the research constitutes a contribution to the knowledge of *Rhizobium*-rice interaction; it also contributes in the identification, characterization and selection of bacterial strains with potential for the development of bioproducts that positively impact the environment, the economy and the society.

Keywords: rhizobia; PGPR; grasses; growth; endophytes

INTRODUCCIÓN

Cuba es uno de los países con mayor consumo de arroz (*Oryza sativa* L.). Sin embargo, las importaciones constituyen la mayor fuente de suministro para el mercado interno, ⁽¹⁾ por lo que se buscan variedades con elevado potencial de rendimiento y tolerancia. La introducción y generalización de los cultivares INCA LP-5 e INCA LP-7, ha tenido un fuerte impacto en la agricultura y economía cubanas, pues permiten obtener rendimientos superiores a 7 t ha⁻¹ en época poco lluviosa y 5 t ha⁻¹ en época lluviosa, son resistentes a *Pyricularia oryzae*, el principal patógeno fúngico del país; INCA LP-7 es tolerante

a la salinidad, y ambos constituyen el 12 % del área que se destina al cultivo en la isla. ⁽²⁾

La aplicación de fertilizantes minerales suple parte de las necesidades nutricionales del cultivo. Sin embargo, su empleo irracional encarece el proceso productivo e impacta negativamente en los ecosistemas. ⁽³⁾ El aislamiento, caracterización y empleo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) rizosféricas y endófitas, constituye una alternativa a la fertilización mineral, ⁽⁴⁾ pues promueven el crecimiento de las plantas mediante mecanismos directos como la fitoestimulación y la disponibilidad y absorción de los nutrientes; y tam-

bién a través de mecanismos indirectos como la producción de compuestos aleloquímicos y la inducción de respuesta sistémica en las plantas. ⁽⁵⁾

Los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Herbaspirillum*, figuran dentro de los principales representantes de la comunidad bacteriana asociada al arroz en Cuba. ^(6,7,8) Sin embargo, escasos estudios se focalizan en la caracterización de cepas y en aspectos ecológicos de la interacción bacteria-arroz, sobre todo en los cultivares INCA LP-5 e INCA LP-7 que poseen especial interés. La investigación tuvo como objetivo: Obtener y caracterizar cepas bacterianas asociadas a 2 cultivares de arroz de amplia distribución en Cuba, en cuanto a sus potencialidades como bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

MÉTODOS

Identificación de bacterias asociadas a plantas de arroz

Se realizó el aislamiento de bacterias a partir de suelo rizosférico y del rizoplano de las plantas de arroz cultivares INCA LP-5 e INCA LP-7. ^(9,10) Además se aisló parte de la microbiota bacteriana del interior de semillas de ambos cultivares. Las semillas se desinfectaron según lo descrito previamente. ⁽¹¹⁾ y se maceraron en solución salina (NaCl 0,9 % m/v). La suspensión se cultivó en el medio triptona extracto de levadura (TY) ⁽¹²⁾ y el cultivo se incubó por 5 días a 30 °C.

La amplificación por PCR y secuenciación parcial del gen *ARNr16S* se realizó según investigaciones previas. ^(13,14) Se emplearon los cebadores universales Eub27f (5'-GAGTTT-GATCMTGGCTCAG-3) y Eub1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTA-CGACTT-3). ⁽¹⁵⁾

Las secuencias consenso se compararon con la base de datos del GenBank ⁽¹⁶⁾ y la depuración y el alineamiento de las secuencias se procesaron según lo descrito previamente. ^(17,18)

Caracterización como bacterias promotoras del crecimiento vegetal potencialidades biofertilizantes

Las cepas se cultivaron en los medios fosfatado del Instituto Nacional de Investigaciones Botánicas (NBRIP) ⁽¹⁹⁾ y glucosa- extracto de levadura (GL) Agar, ⁽²⁰⁾ para la solubilización de fosfato de calcio, y en el medio Aleksandrov ⁽²¹⁾ para la solubilización de potasio. La capacidad solubilizadora se detectó por la presencia de halos traslúcidos alrededor de las colonias, a las 72 h de cultivo. ⁽¹⁴⁾

Un acercamiento a la capacidad de las cepas para fijar di-nitrógeno se determinó mediante su cultivo en medios semi-sólidos libres de nitrógeno Rennie ⁽²²⁾ y JMV. ⁽²³⁾ Los cultivos se

incubaron a 28 °C, 15 días. La capacidad de crecer en estos medios se detectó por la presencia de regiones opacas ó turbias en la superficie y el interior del medio. La producción de sideróforos se determinó en el medio Cromo Azurol Sulfonato agar, ⁽²⁴⁾ a partir de la formación de un halo naranja alrededor de las colonias, a las 72 h de crecimiento. ⁽²⁵⁾

Potencialidades fitoestimulantes

La capacidad de los aislados para producir compuestos indólicos se determinó mediante el método colorimétrico ⁽¹³⁾ y se emplearon 200 µg mL⁻¹ de triptófano como inductor de la síntesis.

Potencialidades para la colonización y el biocontrol

Se determinó la capacidad para producir enzimas con actividad hemicelulasa, celulasa y proteasa. La presencia de halos traslúcidos alrededor de las colonias se interpretó como positivo a la producción de las enzimas. ^(14,26) Además, se determinó la producción de biopelículas mediante el método de violeta cristal. ⁽²⁶⁾

Se evaluó la capacidad endofítica de algunas de las cepas bacterias en plántulas de arroz. Para ello, se obtuvieron transconjugantes bacterianos que se inocularon en plántulas de arroz y se visualizaron los tejidos vegetales mediante microscopía confocal. ⁽²⁷⁾ Para la construcción de la cepa transconjugante, se empleó el plásmido pHc60 el cual contiene un gen *gfp* de proteína verde fluorescente. El plásmido se movilizó hacia la cepa de interés, mediante el método de conjugación triparental. ⁽²⁸⁾

El estudio de colonización se realizó según lo descrito en una investigación previa con plantas de arroz cultivares INCA LP-5 e INCA LP-7 en condiciones *in vitro*. Se obtuvieron cortes longitudinales y transversales de la raíz y vaina de la hoja de las plantas inoculadas y se visualizaron en un microscopio laser confocal. ⁽²⁷⁾

Los estudios de biocontrol se basaron en determinar la capacidad antagonista *in vitro* de algunas cepas bacterianas frente a *P. oryzae*. Se empleó el método del cultivo dual en medio papa dextrosa sólido. La presencia de un halo de inhibición del crecimiento del hongo alrededor de las colonias bacterias a los 16 días de incubación, se interpretó como actividad antagónica positiva. ⁽²⁹⁾

Promoción del crecimiento en plantas de arroz

Ensayos *in vitro*

Los ensayos se realizaron con las cepas provenientes del interior de las semillas de arroz. Las semillas se desinfectaron superficialmente ⁽¹¹⁾ y se colocaron en potes plásticos con 50 mL de solución nutritiva de Hoagland diluida (1:2). Se

inocularon con las cepas (10^8 UFC mL⁻¹) y se emplearon semillas no inoculadas como control negativo. Se empleó la cepa *Herbaspirillum seropedicae* Z67 como control positivo del ensayo. ^(30,31) Se emplearon 30 plantas por tratamiento.

Las plántulas crecieron en condiciones controladas de luz, humedad y temperatura. ⁽¹¹⁾ A los 21 días postinoculación (dpi) se evaluó la altura (cm), el largo de la raíz (cm), la masa fresca y seca de la parte aérea (mg) y de raíz (mg).

Ensayos en condiciones controladas

Los ensayos se realizaron con las cepas provenientes de la rizosfera. Al momento de la siembra, las semillas se inocularon con 300 µL de los inoculantes bacterianos. Semillas sin inocular se emplearon como control negativo. Las cepas se inocularon en su cultivar de procedencia y se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con 10 macetas por tratamiento. ⁽¹¹⁾

A los 50 dpi se evaluó la altura de las plantas (cm), el largo de la raíz (cm), la masa seca aérea (g) y la masa seca de raíz (g). Además, se determinó el contenido de nitrógeno, fósforo y potasio en la parte aérea y raíces (%). ⁽³²⁾

Ensayos en condiciones semicontroladas

Estos ensayos se realizaron con las cepas provenientes de la rizosfera de ambos cultivares de arroz. Se emplearon macetas de 1,2 kg de capacidad, que contenían el mismo volumen de suelo gleysol nodular ferruginoso petroférico y la inoculación de las semillas se realizó como se describió en el ensayo en condiciones controladas. Se emplearon controles positivo y negativo, similares a los que se usaron en el ensayo en condiciones *in vitro*. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado y se emplearon 6 macetas por tratamiento.

A los 70 dpi se evaluó la altura de las plantas (cm) y el largo de la raíz (cm), la masa seca de la parte aérea y radical (g). Se determinó el índice relativo del contenido de clorofilas totales (SPAD). Además, se evaluó el contenido de proteínas solubles totales ($\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca) en hojas y raíces ⁽³³⁾ y el número de hijos por planta.

Experimentos en campo

Se realizaron 3 experimentos en campo, en suelos gleysol nodular ferruginoso petroférico de Los Palacios en Pinar del Río, Cuba y se emplearon semillas certificadas del cultivar INCA LP-7. El primero se realizó según lo descrito previamente ⁽³⁴⁾ y se utilizaron 3 de las cepas de *Rhizobium*: 5P1, Rpd16 y Rpr11 más el 40 % de la fertilización nitrogenada. Los otros experimentos se realizaron de manera similar al primero, pero con ligeras variaciones y aplicando un 60 % del fertilizante nitrogenado. En el segundo se empleó un área experimental

de 30 m² y en el tercer experimento, en lugar de varias cepas, solo se empleó la cepa 5P1 en 2 concentraciones: 10E7 y 10E8 UFC mL⁻¹, en un área total de 0,02 ha. En todos los casos se incluyeron 2 tratamientos testigos: plantas sin inocular ni fertilizar y plantas no inoculadas pero fertilizadas con el 100 % de la dosis de nitrógeno recomendada. ⁽³⁾ En la etapa de cosecha se determinó el rendimiento (t ha⁻¹) para un 14 % de humedad del grano.

Análisis biométricos

Los datos provenientes de los ensayos de inoculación en plantas de arroz se sometieron a la prueba de normalidad y homogeneidad de varianza. Se aplicó análisis de varianza de clasificación simple, con la prueba de comparación de medias de Tukey (condiciones controladas y semicontroladas) o Duncan (condiciones de campo) ($p < 0,05$); para determinar diferencias entre las medias. Se empleó el programa Statgraphic Plus versión 5.0 para el procesamiento estadístico de los datos.

RESULTADOS

Diversos géneros bacterianos colonizan la rizosfera y el interior de semillas de plantas de arroz cultivares INCA LP-5 e INCA LP-7

Se obtuvieron un total de 43 aislados bacterianos, 21 provinieron del cultivar INCA LP-5 y 22 de INCA LP-7. En el cultivar INCA LP-5, 10 aislados se obtuvieron del rizoplano de las plantas, 2 del suelo rizosférico y los restantes 9 del interior de las semillas. En el cultivar INCA LP-7 no se obtuvo ningún aislado del rizoplano, 12 provinieron del suelo rizosférico y 10 del interior de las semillas.

La secuenciación parcial del gen *ARNr 16S* permitió identificar los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Pantoea* y *Paenibacillus*, asociados al cultivar INCA LP-5. Estos géneros junto a *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Mitsuaria* se identificaron en el cultivar INCA LP-7.

Bacterias asociadas al arroz poseen atributos como promotoras del crecimiento vegetal y capacidad endofítica

Los resultados mostraron que algunas de las cepas bacterianas solubilizaron el fosfato de calcio y de potasio, crecieron en medios semisólidos libre de nitrógeno, produjeron sideróforos y compuestos indólicos. Además, excretaron enzimas con actividad hemicelulasa, exocelulasa, proteasa y formaron biopelículas (tabla 1).

Por otra parte, Hernández et al. (2021) demostraron, con el empleo de microscopía confocal de fluorescencia, que una cepa transconjugante de *Rhizobium* portadora del gen de pro-

teína verde fluorescente (*Rhizobium* sp. Rpd16pHC60) colonizó sistémicamente plántulas de arroz. La cepa se localizó en el parénquima de la raíz y de la vaina de la hoja, así como el interior de una célula de la raíz; a solo 48 h de la inoculación. Otros resultados mostraron la presencia de la cepa *Rhizobium* sp. 5P1pHC60, potadora también del gen *gfp*, en el parénquima de la raíz en plántulas de arroz, a los 10 días de la inoculación (figura 1). Ambas evidencias demuestran el carácter endofítico de cepas de *Rhizobium* en la gramínea.

La inoculación de bacterias asociadas a la rizosfera y semillas de plantas de arroz promueve el crecimiento del cultivo

Los resultados mostraron que la inoculación de cepas provenientes de semillas incrementó la altura, la masa fresca de raíz y la masa seca de la parte aérea y de raíz de plántulas cultivar INCA LP-5 e INCA LP-7, a los 21 d de cultivo *in vitro*.

Otro conjunto de experimentos mostraron que la inoculación de algunas cepas rizosféricas de arroz incrementó la altura, la masa seca de la parte aérea y de raíz de plantas de arroz cultivar INCA LP-5, a los 50 dpi. ⁽¹¹⁾ Un comportamiento similar se evidenció en el cultivar INCA LP-7, en el cual la inoculación de algunos aislados incrementó además el largo de la raíz y el contenido de potasio y nitrógeno ⁽³⁴⁾ (tabla 2).

Un tercer grupo de experimentos mostró que la inoculación de algunas cepas del género *Rhizobium* incrementó la altura, la longitud de la raíz, la masa seca aérea y la masa seca de raíz. Además se apreció un efecto positivo en variables fisiológicas como el contenido de clorofilas, proteínas solubles totales (tabla 3) y carbohidratos solubles totales en hojas y raíces de las plantas de arroz. ⁽³⁴⁾

Por último, 3 experimentos en condiciones de campo con el cultivar INCA LP-7 mostraron que con la inoculación de diferentes concentraciones de cepas de *Rhizobium* se incrementa el rendimiento del arroz entre un 32,8 % a 84,4 % y es posible disminuir la fertilización nitrogenada de la gramínea de un 40 % a un 60 % (tabla 4).

DISCUSIÓN

El presente estudio permitió identificar 8 géneros bacterianos asociados a la rizosfera y semillas de los cultivares cubanos de arroz INCA LP-5 e INCA LP-7: *Rhizobium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Mitsuaria*, *Enterobacter*, *Bacillus* y *Paenibacillus*. Las características químico-físicas del suelo, la edad, la expresión génica de la planta y la quimiotaxis que ejercen los exudados radicales sobre los microorganismos del suelo, son factores que pudieran explicar dicha asociación. ^(35,36)

Tabla 1. Porcentaje de cepas rizosféricas y del interior de semillas de plantas de arroz cultivares INCA LP-5 e INCA LP-7 con potencialidades biofertilizante, fitoestimulante, biocontroladora y con atributos para la infección y colonización

Cultivar de arroz	Resp	Biofertilización y Fitoestimulación (porcentaje) a					Infección y colonización (porcentaje) b					Biocontrol (porcentaje) c	
		NBRIP	GL	K	JMV	Rennie	SID	Comp. Ind	HC	EC	Prot	Biop	
INCA LP-5	+	33,3	19	4,8	95,2	95,2	52,4	66,7	0	33,3	47,6	76,2	23,8
	-	66,7	81	95,2	4,8	4,8	19	33,3	0	66,7	52,4	23,8	0
INCA LP-7	nd											76,2	
	nc						28,6					0	
INCA LP-7	+	45,5	72,7	13,6	59,1	59,1	50	81,9	13,6	22,7	18,1	63,6	13,6
	-	54,5	27,3	86,4	40,9	40,9	40,9	18,1	86,4	77,3	81,9	36,4	0
INCA LP-7	nd											86,4	
	nc						9,1					0	

a) NBRIP, solubilización de fosfato de calcio inorgánico; K, solubilización de potasio; JMV, Rennie, crecimiento en medios semisólidos libre de nitrógeno; SID, producción de sideróforos; Comp. Ind., Producción de compuestos indólicos. b) HC, actividad Hemicelulasa; EC, actividad exocelulasa; Prot, actividad proteasa; Bio, producción de biopelículas. c) Actividad antagonista frente a *Pyricularia oryzae* a los 16 días de incubación; nd, no determinado; nc, no crecimiento en el medio de cultivo; (+), positivo; (-), negativo. Fuente: Hernández et al. Resultado de la investigación que se presenta.

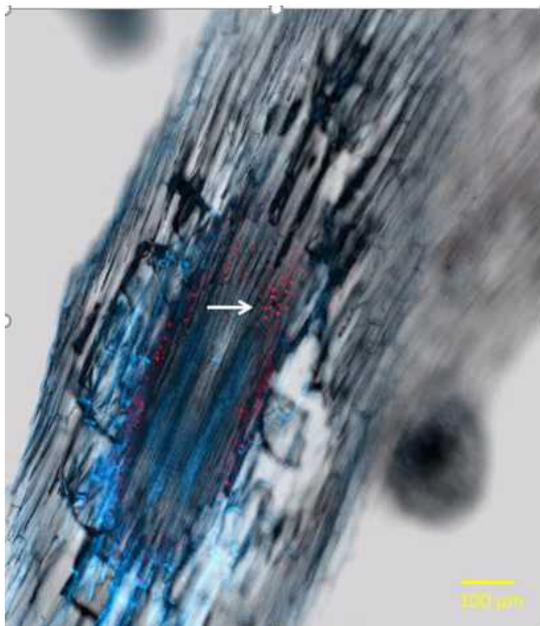


Fig. 1. Imagen de microscopía confocal de fluorescencia de una sección longitudinal de tejidos radicales de plántulas de arroz de 10 d de edad, inoculada con la cepa *Rhizobium* sp. 5P1PHC60, portadora del gen *gfp*. Las células del transconjugante se visualizan de color rojo. El color azul es autofluorescencia del tejido de la plántula. Fuente: Hernández et al. Resultados de la investigación que se presenta.

Por primera vez en las ciencias biológicas se identifica el género *Rhizobium* asociado a la especie *Oryza sativa* L., cultivada en monocultivo intensivo y sin antecedentes de inoculación con rizobios, ni de rotación con leguminosas. Además, los géneros *Enterobacter*, *Mitsuaria* y *Acinetobacter* se identifican por vez primera asociados a un cultivar cubano de arroz.

La caracterización de las cepas bacterianas permitió identificar potencialidades biofertilizantes, fitoestimulantes, biocontroladoras y atributos positivos para la infección y colonización de las plantas. El empleo de bacterias con capacidad para solubilizar fosfatos de calcio y potasio, producir sideróforos y fijar nitrógeno, supone un ahorro de fertilizante mineral, con el consiguiente impacto positivo en el ambiente y en la economía. La actividad fitoestimulante, mediante la producción de compuestos indólicos, contribuiría de manera sinérgica con la biofertilización en la promoción del crecimiento del arroz.

La producción de enzimas hidrolíticas como hemicelulasas, exocelulasas y proteasas y la formación de biopelículas, también potencian la actividad promotora de las cepas bacterianas, pues le permiten infectar, colonizar e incluso comportarse como endófitos. (37) En este trabajo se logró demostrar que cepas de *Rhizobium* colonizaron los espacios intercelulares del parénquima de la raíz y de la vaina de la hoja. Esta evidencia constituye la primera de su tipo en Cuba que de-

muestra la capacidad endofítica de *Rhizobium* en gramíneas, a partir de una colonización sistémica.

La producción de enzimas hidrolíticas y el comportamiento endofítico de las bacterias son atributos que permitirían disminuir la incidencia de fitopatógenos. (38) En este trabajo se demuestra por primera vez, la actividad antagonista de cepas de *Rhizobium* frente a *P. oryzae*, patógeno que puede causar pérdidas de hasta el 80 % de los rendimientos del arroz.

La estimulación del crecimiento vegetal es el resultado de la acción de múltiples mecanismos actuando simultáneamente. (39) Por lo tanto, uno de los aspectos novedosos de este estudio no solo fue conformar un cepario con bacterias que de manera natural se asocian al arroz, lo que necesariamente implica un alto nivel de adaptación e interacción con la planta; sino también contar con información relevante de las potencialidades de cada cepa para promover el crecimiento vegetal.

Ensayos de inoculación en diferentes condiciones experimentales comprobaron su efecto positivo en el crecimiento y desarrollo del arroz. Por primera vez en el país se demuestra que cepas de los géneros *Rhizobium* y *Pantoea*, provenientes de la rizosfera del arroz, promueven la altura, masa seca y fresca de la parte aérea y radical de las plantas; así como el contenido de nitrógeno, fósforo, potasio, contenido relativo de clorofilas totales y de carbohidratos y proteínas solubles totales. La mayoría de las investigaciones que abordan la interacción rizobio-arroz, refieren la fitoestimulación y la estimulación de la fotosíntesis como principales mecanismos de promoción del crecimiento. (40-42).

Experimentos en campo demuestran los beneficios de la aplicación de rizobios en el rendimiento del arroz. (43-45) Sin embargo, los resultados de esta investigación constituyen los primeros en Cuba que demuestran que la aplicación de *Rhizobium* incrementa el número de granos llenos por panícula y el peso de 1000 granos. (34) Se logra incrementar el rendimiento del arroz (t ha⁻¹) en más del 50 %, en áreas que pudieran considerarse lo suficientemente extensas para la validación del producto y en más de un 80 % en áreas más pequeñas. Los resultados poseen como valor agregado la posibilidad de reducir la fertilización nitrogenada mineral de un 40 % a 60 %. Esto supone un impacto positivo en el ambiente y en la economía, si se tiene en cuenta las extensas áreas que se dedican al cultivo del arroz en el país y la necesidad del cereal para los cubanos.

Microorganismos adaptados a condiciones específicas del suelo de donde se aíslan y que son seleccionados por la planta, poseen mayor probabilidad de éxito como productos fitoestimulantes y biofertilizantes. Tales aspectos, junto a su inocuidad y capacidad de multiplicarse, constituyen la esencia de inoculantes a base de BPCV efectivos en campo.

Tabla 2. Efecto de la inoculación de cepas bacterias provenientes del interior de semillas en el crecimiento de plántulas de arroz cultivares INCA LP-5 e INCA LP-7 a los 21 dpi. Letras iguales en la misma columna muestran que no hay diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey HSD $p < 0,05$; $n = 30$)

Tratamientos	Altura (cm)	Largo de raíz (cm)	Masa fresca aérea (mg)	Masa fresca raíz (mg)	Masa seca aérea (mg)	Masa seca raíz (mg)
INCA LP-5						
S5-1	14,3 a	8,9 ab	36,2 a	44,3 a	8,1 ab	6,7ab
S5-30	11,5 c	8,3 b	35,0 a	41,9 ab	7,1 d	6,4 c
S5-31	13,2 ab	8,7 ab	33,9 a	40,4 ab	7,4 bcd	6,6 ab
S5-38	13,6 ab	9,4 a	34,1 a	44,0 a	8,1 a	7,1 a
H. seropedicae Z67	13,5 ab	8,7 ab	37,9 a	38,3 b	8,0 abc	6,9 ab
Control negativo	12,4 bc	9,2 ab	32,9 a	37,5 b	7,3 cd	6,5 c
ESx.	0,3	0,2	1,4	1,1	0,2	0,2
INCA LP-7						
S7-1	14,6 a	9,5 b	38 a	37 a	8,1 a	6,8 b
S7-3	14,7 a	8,9 b	36 ab	33 ab	7,8 a	7,0 ab
S7-4	14,6 a	9,9 ab	35 ab	36 ab	7,5 a	7,0 ab
S7-6	14,2 ab	9,6 ab	35 ab	35 ab	7,5 a	7,3 ab
H. seropedicae Z67	14,5 a	9,7 ab	34 b	31 b	7,6 a	6,9 b
Control negativo	13,3 b	10,7 a	34 b	33 ab	7,5 a	7,6 a
ESx.	0,3	0,3	0,8	1,2	0,2	0,2

Fuente: Hernández et al. Resultados de la investigación que se presenta.

Tabla 3. Efecto de las cepas de Rhizobium y de H. seropedicae Z67 (control positivo) en el crecimiento de plantas de arroz de los cultivares INCA LP-5 e INCA LP-7, a los 70 dpi, en condiciones semicontroladas. Medias con letras iguales en la misma columna no difieren significativamente (Tukey $p < 0,05$ y $n = 6$)

Tratamientos	Altura (cm)	Longitud raíz (cm)	MSA (g)	MSR (g)	Clorofilas (SPAD)	Proteínas solubles totales (mg g ⁻¹)		No. Hijos (u)
						Hojas	Raíces	
INCA LP-5								
Control negativo	32,92 b	28,22	0,722 b	0,282 b	35,897	29,80 a	6,64 a	3,8
Control positivo	43,72 a	28,30	1,458 a	0,500 ab	33,600	24,69 c	6,96 a	4,5
Rpr11	44,53 a	28,17	1,482 a	0,658 a	35,333	25,44 bc	6,64 a	4,1
Rpd16	42,97 a	27,12	1,423 a	0,633 a	37,245	30,95 a	6,77 a	4,0
Rpr2	39,30 ab	23,07	1,002 ab	0,415 ab	37,058	27,36 b	5,10 b	4,2
ESx	2,09*	1,92 NS	0,079*	0,083*	1,910 NS	0,54*	0,34*	0,3 NS
INCA LP-7								
Control negativo	30,81 b	21,63 c	0,544 b	0,400 b	24,182 b	23,20 c	6,39 b	3,0 b
Control positivo	44,82 a	28,70 a	1,504 a	0,886 a	26,252 a	30,32 a	8,71 a	4,8 a
5P1	42,10 a	28,20 ab	1,356 a	0,615 ab	27,225 a	32,37 a	7,83 a	3,6 ab
1AA	37,00 ab	23,50 bc	0,895 ab	0,583 ab	25,854 ab	27,18 b	8,45 a	4,2 ab
ESx	2,54*	1,21*	0,199*	0,115*	0,179*	0,74*	0,37*	0,4*

Leyenda: Control negativo, Medio LM estéril; Control positivo, Cepa de referencia H. seropedicae Z67; MSA, masa seca aérea; MSR, masa seca de raíz; MSA / MSR, relación MSA y MSR; No. hijos, número de hijos. Fuente: Hernández et al. Resultados de la investigación que se presenta.

Tabla 4. Efecto de la inoculación de cepas de *Rhizobium* en el rendimiento de arroz cultivar INCA LP-7 en condiciones de campo, con dosis reducidas de fertilizante nitrogenado

Experimentos	Área	Fertilización nitrogenada	Cepas	Rendimiento del grano (t ha ⁻¹)	Incremento de rendimiento respecto al control sin fertilizar ni inocular (%)
1 ^a	9 m ²	40 %	<i>Rhizobium</i> sp. 5P1	6,4	84,4
			<i>Rhizobium</i> sp. Rpd16	4,3	75,6
			<i>Rhizobium</i> sp. Rpr11	1,6	32,8
2 ^b	30 m ²	60 %	<i>Rhizobium</i> sp. 5P1	5,4	53,8
			<i>Rhizobium</i> sp. Rpd16	4,6	46,5
			<i>Rhizobium</i> sp. Rpr11	4,3	42,5
3 ^b	0,02 ha	60 %	<i>Rhizobium</i> sp. 5P1 (10E8 UFC mL ⁻¹)	6,0	50,6
			<i>Rhizobium</i> sp. 5P1 (10E7 UFC mL ⁻¹)	5,3	
					44,2

^aResultados publicados en Hernández *et al.*, 2021⁽³⁴⁾; ^bHernández *et al.* Resultados de la investigación que se presenta

Conclusiones

La presente propuesta constituye un aporte al conocimiento sobre la interacción *Rhizobium*-arroz; la identificación, caracterización y selección de cepas asociadas a 2 cultivares de importancia por su rendimiento y tolerancia a estreses bióticos y abióticos. Los resultados constituyen la base de nuevos bioproductos para el cultivo, tributando al desarrollo de tecnologías novedosas, limpias, económicamente viables, que pueden insertarse en la práctica productiva del arroz y contribuir a la soberanía alimentaria del país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FAO. 2019. Food Outlook Biannual Report On Global Food Markets. [Internet] [consultado 6 jun 2019]. Disponible en: <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/oilcrops/oilcrop-policies>
2. MINAG. 2019. Plan 2018-2019 de Producción de semilla de arroz en Cuba. [Internet] [consultado 17 apr 2019] Disponible en: <https://www.minag.gob.cu/node/167>
3. MINAG. 2005. Modificaciones al Instructivo Técnico para el cultivo del arroz. 14ta ed. Instituto de Investigaciones del Arroz, Ministerio de la Agricultura, Cuba. ISBN: 959-246-037-X
4. Zaidi A, Khan MS, Ahemad M, Oves M, Wani PA. Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. In: Khan MS, editor. Microbial Strategies for Crop Improvement. Berlin Heidelberg; 2009:23-50
5. Singh H, Jaiswal V, Singh S, Tiwari SP, Singh B, Katiyar D. Antagonistic compounds producing plant growth promoting rhizobacteria: a tool for management of plant disease. J Adv Microbiol. 2017;3(4):1-12. ISSN: 2456-7116
6. Rives N, Hernández A, Acebo Y, Heydrich M. Caracterización de algunos géneros bacterianos asociados al cultivo del arroz variedad J-104. Revista Cubana del Arroz. 2006;2:7-13
7. Rives N, Vega M, Díaz A, Acebo Y, Muñiz O, Hernández A. Aislamiento y caracterización molecular de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno asociadas a 4 variedades comerciales de arroz. Revista Cubana del Arroz, 2010;12:68-82.
8. Tejera B, Heydrich M, Rojas MM. Aislamiento de Bacillus solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo del arroz. Agro Mesam. 2013;24(2):357-64
9. Ulacio D, Pérez C, Pineda J. Microflora asociada a las raíces de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) provenientes del Estado Portuguesa. Bioagro. 1997;9(1):3-7. ISSN: 1316-3361
10. Knief C, Delmotte N, Chaffron S, Stark M, Innerebner G, Wassmann R, von Mering Ch, Vorholt JA. Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. The ISME journal. 2012;6(7):1378-90. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.192>
11. Hernández I, Nápoles MC. Rhizobia Promote Rice (*Oryza sativa* L.) Growth: First Evidence in Cuba. En González F, Zúñiga D, Ormeño E. editors. Microbial Probiotics for Agricultural Systems: Advances in agronomics use. Springer Nature Switzerland AG. 2019:155-68. ISBN: 978-3-030-17596-2.
12. Josey DP, Beynon JL, Johnston AWB, Beringer JE. Strain identification in *Rhizobium* using intrinsic antibiotic resistance. J Appl Bacteriol. 1979;46(2):343-50. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1979.tb00830.x>
13. Taulé C, Mareque C, Barlocco C, Hackembruch F, et al. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. Plant Soil. 2011;356(1-2):35-49. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1023-4>

14. Mareque C, Taulé C, Beracochea M, Battistoni F. Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). *Ann Microbiol.* 2015;65(2):1057-67. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0951-7>
15. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *J Bacteriol.* 1991;173(2):697-703. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
16. Benson DA, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Research.* 2015;43(Database issue):D30-5. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/nar/gku1216>
17. Beligala D. Identification of rhizobial symbionts associated with *Lupinus* spp. [Internet] [degree of Master of Science]. [Ohio, USA]: Graduate College of Bowling Green State University; 2015. Disponible en: https://etd.ohiolink.edu/!etd.send_file?accession=bg-su1435855654&disposition=inline
18. Gómez E, Ruiz B, Fajardo S, Eichler B, Samson R, van Damme P, López R, Fernández M. Caracterización de rizobios aislados de nódulos de frijol Caupí, en suelos salinos de Cuba. *Cultivos Tropicales.* 2017;38(4):39-49. ISSN 1819-4087
19. Nautiyal C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999;170(1):265-70. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
20. Sylvester R, Askawa N, Latorraca S, Magalhães F, Oliveira L, Pereira R. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amazô.* 1982;12(1):15-22. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/1809-43921982121015>
21. Avakyan ZA, Pivovarova ad Karavaiko GI. Properties of new species *Bacillus mucilaginosus*. *Mikrobiol.* 1986;55(3):477-82. ISSN: 0555-1099
22. Rennie RJ. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Can J Microbiol.* 1981;27(1):8-14.
23. Baldani JI, Pot B, Kirchoff G, Falsen E, Baldani VLD, Olivares FL, Döbereiner J. Emended description of *Herbaspirillum*; incursion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. Nov.; and classification of a Group of Clinical Isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1996; 46(3):802-10.
24. Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem.* 1987;160(1):47-56. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
25. Rosconi F, Trovero MF, de Souza EM, Fabiano E. Serobactins-mediated iron acquisition systems optimize competitive fitness of *Herbaspirillum seropedicae* inside rice plants. *Environ Microbiol.* 2016;18(8):2523-33. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13202>
26. de los Santos, MC, Taulé C, Mareque C, Beracochea M, Battistoni F. Identification and characterization of the part of the bacterial community associated with field-grown tall fescue (*Festuca arundinacea*) cv. SFRO Don Tomás in Uruguay. *Ann Microbiol.* 2015;66:329-42. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1113-2>
27. Hernández I, Taulé C, Pérez-Pérez R, Battistoni F, Fabiano E, Rivero D, Nápoles MC. Endophytic rhizobia promote the growth of Cuban rice cultivar. *Symbiosis.* 2021. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s13199-021-00803-2>
28. Cheng HP, Walker GC. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol.* 1998;180(19):5183-91.
29. Cruz A, Rivero D, Martínez B, Echevarría, A, Rodríguez, A. Evaluación de la actividad antifúngica de *Trichoderma asperellum* Samuels ante patógenos fúngicos que afectan al cultivo de la soya (*Glycine max* L.). *Cultivos Tropicales.* 2017;38(4):15-21. ISSN 1819- 4087
30. Gyaneshwar P, James EK, Reddy PM, Ladha JK. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. *New Phytologist.* 2002;154(1):131-45. Disponible en: <https://10.1046/j.1469-8137.2002.00371.x>
31. Radwan TESED, Mohamed ZK, Reis VM. Effect of inoculation with *Azospirillum* and *Herbaspirillum* on production of indolic compounds and growth of wheat and rice seedlings. *Pesqui Agropecu Bras.* 2004;39(10):987-94. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2004001000006>
32. Paneque VM, Calaña JM, Calderón M, Borges Y, Hernández T, Caruncho M. Manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos. La Habana, Cuba: Ediciones INCA; 2010. 62 p. ISBN: 978-050-7023- 50-0
33. Sun SSM. MicroLowry method. In: ROC editors. *Methods in Plant Molecular Biology and Agricultural Biotechnology.* Asian Vegetable Research and Development Center; 1994, 9-11
34. Hernández I, Pérez-Pérez R, Nápoles MC, Maqueira LA, Rojan O. Rhizospheric rhizobia with potential as biofertilizers from Cuban rice cultivars. *Agronomía Colombiana.* 2021; 39(1), p. 26-37. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15446/agron.colomb.v39n1.88907>
35. Rodríguez DN, Dardanelli MS, Ruíz JE. Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *Fems Microbiol Lett.* 2007; 272(2): 127-36. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00761.x>
36. Reinhold-Hurek B, Bunger W, Burbano CS, Sabale M, Hurek T. Roots Shaping Their Microbiome: Global Hotspots for Microbial Activity. *Annu Rev Phytopathol.* 2015;53:403-24. ISSN: 1545-2107
37. Monteiro RA, Balsanelli E, Wassem R, Marin AM, Brusamarello-Santos LCC, Schmidt MA, TadraSfeir MZ, Pankiewicz VCS, Cruz LM, Chubatsu LS, Pedrosa FO, Souza EM. *Herbaspirillum*-plant interactions: Microscopical, histological and molecular aspects. *Plant Soil.* 2012;356(1-2):175-96. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-012-1125-7>
38. Wang M, Xing Y, Wang J, Xu Y, Wang G. The role of the *chi1* gene from the endophytic bacteria *Serratia proteamaculans* 336x in the biological control of wheat take-all. *Can J Microbiol.* 2014;60(8):533-40. Disponible en: <https://doi.org/10.1139/cjcm-2014-0212>
39. Glick BR. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica.* 2012;1:1-15. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>
40. Chaintreuil C, Giraud E, Prin Y, Lorquin J, Gills M, De Lajudie P, Dreyfus B. Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of

- the African Wild Rice *Oryza breviligulata*. Appl Environ Microbiol. 2000;66(12):5437-47. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5437-5447.2000>
41. Mirza MS, Ahmad W, Latif F, Haurat J, Bally R, Malik KA. Isolation, partial characterization and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. Plant Soil. 2001;237(1):47-54. Disponible en: <https://doi.org/10.1023/A:1013388619231>
42. Chi F, Yang P, Han F, Jing Y, Shen S. Proteomic analysis of rice seedlings infected by *Sinorhizobium meliloti* 1021. Proteomics. 2010;10(9):1861-74. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/pmic.200900694>
43. García P, Carro L, Robledo M, Ramírez-Bahena MH, Flores-Félix JD, Fernández MT, Mateos PF, Rivas R, Igual JM, Martínez-Molina E, Peix A, Velázquez E. *Rhizobium* Promotes Non-Legumes Growth and Quality in Several Production Steps: Towards a Biofertilization of Edible Raw Vegetables Healthy for Humans. PLoS ONE. 2012;7(5):1-7. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038122>
44. Hahn L, de Sá EL, Osório Filho BD, Machado RG, Damasceno RG, Giongo A. *Rhizobial* Inoculation, Alone or Coinoculated with *Azospirillum brasilense*, Promotes Growth of Wetland Rice. Rev Bras Cienc Solo. 2016;40:1-15. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/18069657rbc20160006>
45. Lemes F, Bonilha F, Saccol EL, Vian AL, Westphal A, Nunes R. Inoculation and co-inoculation of growth promoting rhizobacteria in irrigated rice plants. Revista Brasileira de Ciências Agrárias. 2019;4(3):1-5. Disponible en: <https://doi.org/10.5039/agraria.v14i3a5665>
- Curación de datos: Ionel Hernández Forte, Lázaro Alberto Maqueira López
 - Análisis formal: Ionel Hernández Forte
 - Adquisición de fondos: Ionel Hernández Forte, Federico Battistoni Urrutia, María Caridad Nápoles García
 - Investigación: Ionel Hernández Forte, Lázaro Alberto Maqueira López
 - Metodología: María Caridad Nápoles García
 - Administración del proyecto: María Caridad Nápoles García
 - Recursos: María Caridad Nápoles García, Federico Battistoni Urrutia
 - Supervisión: María Caridad Nápoles García
 - Validación: Lázaro Alberto Maqueira López
 - Visualización: Ionel Hernández Forte, María Caridad Nápoles García
 - Redacción-borrador original: Ionel Hernández Forte
 - Redacción-revisión y edición: Ionel Hernández Forte, María Caridad Nápoles García, Lázaro Alberto Maqueira López

Ensayos clínicos

En la presente propuesta no fueron necesarios ensayos clínicos.

Financiación

La investigación estuvo financiada por el proyecto "Los rizobios como alternativa a la fertilización nitrogenada en Cuba" del Programa Alimento Humano (P131LH001236), por la Red Iberoamericana AgroMicrobios y por la Beca Biotecnología para América Latina y el Caribe (UNU-BIOLAC).

Cómo citar este artículo

Hernández Forte I, Nápoles García MC, Maqueira López LA, Battistoni Urrutia F *et al.* Contribución al conocimiento de la interacción *Rhizobium*-arroz (*Oryza sativa* L.). Oportunidades para la biofertilización del cultivo. An Acad Cienc Cuba [internet] 2023 [citado en día, mes y año];13(2):e1329. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/1329>

El artículo se difunde en acceso abierto según los términos de una licencia Creative Commons de Atribución/Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0), que le atribuye la libertad de copiar, compartir, distribuir, exhibir o implementar sin permiso, salvo con las siguientes condiciones: reconocer a sus autores (atribución), indicar los cambios que haya realizado y no usar el material con fines comerciales (no comercial).

© Los autores, 2023.

Recibido: 18/09/2022

Aprobado: 20/12/2022

Agradecimientos

Se agradece por su colaboración a la Red Iberoamericana AgroMicrobios, a su coordinador Dr. Antonio Lagares y a los investigadores René Pérez Pérez, Cecilia Beatriz Taulé Gregorio, Federico Battistoni Urrutia, Elena Fabiano González, Osmany Roján Herrera, Arasay Santa Cruz Suárez y Deyanira Rivero González.

Conflictos de intereses

No existen conflictos de interés en relación con la investigación presentada.

Contribuciones de los autores

- Conceptualización: María Caridad Nápoles García

