



**UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS-POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**RESPUESTA DE PLANTAS NATIVAS A LA INOCULACIÓN CON
RIZOBACTERIAS AISLADAS EN EL PÁRAMO DE RABANAL**

Requisito para optar el título de Magister en Ciencias Biológicas

DAVID RICARDO HERNÁNDEZ VELANDIA

Tunja
Noviembre, 2019



**UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS-POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**RESPUESTA DE PLANTAS NATIVAS A LA INOCULACIÓN EN VIVERO DE
RIZOBACTERIAS AISLADAS EN EL PÁRAMO DE RABANAL**

Requisito para optar el título de Magister en Ciencias Biológicas

DAVID RICARDO HERNÁNDEZ VELANDIA

Director
PhD. LUZ MARINA LIZARAZO FORERO
Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia
Grupo de investigación Biología ambiental

Tunja
Noviembre, 2019



CERTIFICADO DE ORIGINALIDAD

Luz Marina Lizarazo Forero, Doctorado en Biología, profesora Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.

CERTIFICA:

Que el trabajo de grado realizado bajo mi dirección por **David Ricardo Hernández Velandia** titulado “RESPUESTA DE PLANTAS NATIVAS A LA INOCULACIÓN EN VIVERO DE RIZOBACTERIAS AISLADAS EN EL PÁRAMO DE RABANAL”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al título de **Magister en Ciencias Biológicas** otorgado por la **Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia**.

Y para que así conste, firmo la siguiente certificación en Tunja, el 12 de noviembre de 2019.

Luz Marina Lizarazo Forero

Luz Marina Lizarazo Forero. PhD.

Directora

Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia

Coordinadora Grupo de investigación Biología Ambiental



Uptc[®]
Universidad Pedagógica y
Tecnológica de Colombia

UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS - POSGRADOS
PROGRAMA DE POSGRADO: MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Luz Marina Lizarazo

Luz Marina Lizarazo Forero. PhD.
Director

Marcela Franco Correa

Marcela Franco Correa. PhD.
Jurado 1

Mayra Beltrán Pineda

Mayra E. Beltrán Pineda. M.Sc.
Jurado 2



Uptc[®]
Universidad Pedagógica y
Tecnológica de Colombia

**UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS - POSGRADOS
PROGRAMA DE POSGRADO: MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



*A mi Albita y a mi pequeño Emilio,
por su enorme sacrificio y compañía;
A mis padres,
A mi hermano,
por su gran apoyo;
A las profesoras Luz Marina y María Eugenia,
por abrirme las puertas en la Microbiología y la Botánica,
por enseñarme cada día algo nuevo;
por guiarme a este sueño,
que finaliza con grandes experiencias.*



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia y especialmente a la Maestría en Ciencias Biológicas por el apoyo y formación investigativa.

Al Convenio 5211740 “Anuar esfuerzos técnicos, operativos, logísticos, financieros y económicos para adelantar acciones de protección y recuperación del ambiente en el territorio colombiano a través de la ejecución de los Planes de Compensación Ambiental e Inversión, para los proyectos que Ecopetrol S.A. desarrolla en las regiones de la Orinoquía, Centro Oriente y Magdalena Medio”, y al proyecto de Restauración Ecológica de 105 ha en el Parque Natural Regional Rabanal, en el departamento de Boyacá (Municipios de Samacá y Ventaquemada) y en el departamento de Casanare (Municipio de Sabanalarga).

Al Grupo de investigación Biología Ambiental, por brindar todo el apoyo en la fase de laboratorio del proyecto; al Herbario UPTC y al Grupo de investigación Sistemática Biológica, por brindarme todo el apoyo logístico en el desarrollo del proyecto.

A la profesora Luz Marina (Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia) por el constante apoyo como directora de esta Tesis.

A la profesora María Eugenia Morales Puentes por su constante apoyo, consejos y por todo ese conocimiento que compartió conmigo en estos últimos 5 años.

A las profesoras Marcela Franco Correa y Mayra Eleonora Beltrán Pineda, por sus comentarios y sugerencias a la investigación, así como por la evaluación del documento.

A William Javier Bravo, Jeison Adrián Olaya, Karelly Melgarejo, Pablo Andrés Gil, Carlos Nelson Díaz, Clodomiro Gil, Ramiro Meneses y a los demás integrantes del Grupo de investigación SisBio por la amistad y todo el apoyo en la fase de campo del proyecto. A la Profesora Ana Cruz Morillo, Juan Carlos Zabala y Diego Andres Moreno por su constante apoyo y sugerencias para el desarrollo de la Tesis, al profesor Francisco García por el apoyo en la



identificación molecular de las cepas. A Edilma Díaz por su paciencia, colaboración y préstamo del invernadero de la UPTC.

A mis papas, especialmente a mi mamá María Velandia, quien con su apoyo incondicional siempre me motivo para seguir adelante y poder lograr este sueño. A mi Hermano quien me ha colaborado tanto en esta etapa. A Jaime Barón por su apoyo incondicional. A Nohora Camargo y a mi hijo Emilio, quienes son el motor de mi vida, les agradezco por su amor, sacrificio y gran apoyo durante todo este proceso.



TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO I	12
LOS PÁRAMOS Y LOS SUELOS: PROBLEMÁTICA ACTUAL	12
INTRODUCCIÓN	12
El suelo y su importancia en los ecosistemas	14
Propiedades y procesos ecosistémicos del suelo	14
Microorganismos del suelo y su papel como promotores de crecimiento vegetal.....	17
ANTECEDENTES	18
OBJETIVOS	21
OBJETIVO GENERAL.....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
PRODUCTOS DERIVADOS DE ESTE TRABAJO.....	21
BIBLIOGRAFÍA	22
CAPITULO 2	30
RESPUESTA DE <i>Bucquetia glutinosa</i> (L. F.) DC y <i>Pentacalia pulchella</i> (Kunth) Cuatrec., A LA INOCULACIÓN CON RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO AISLADAS EN EL PÁRAMO DE RABANAL	30
RESUMEN	30
INTRODUCCIÓN	31
Área de Estudio.....	33
Fase de Campo.....	33
Muestreo de Suelos	33
Muestreo de semillas.....	34
Fase de laboratorio	34
Aislamiento y cuantificación de bacterias heterótrofas y solubilizadoras de fosfatos.....	34
Rizobacterias productoras de ácido 3-indol acético (AIA).....	36
Identificación bioquímica y molecular de las rizobacterias	37
Preparación de los inoculantes	37



Efecto de la inoculación en la germinación de <i>Bucquetia glutinosa</i> y <i>Pentacalia pulchella</i>	38
Medición de parámetros de crecimiento.....	39
Análisis Estadístico	40
RESULTADOS	41
Análisis fisicoquímicos del suelo	41
Cuantificación de bacterias heterótrofas	41
Identificación molecular de las rizobacterias	42
Solubilización de fosfatos en condiciones <i>in vitro</i>	42
Producción de ácido 3-indol acético en condiciones <i>in vitro</i>	43
Efecto de la inoculación en <i>Bucquetia glutinosa</i> y <i>Pentacalia pulchella</i>	44
DISCUSIÓN	46
Análisis fisicoquímicos del suelo	46
Cuantificación de bacterias heterótrofas	46
Identificación molecular de las rizobacterias	47
Solubilización de fosfatos en condiciones <i>in vitro</i>	47
Producción de ácido 3-indol acético en condiciones <i>in vitro</i>	48
Efecto de la inoculación en <i>Bucquetia glutinosa</i> y <i>Pentacalia pulchella</i>	48
CONCLUSIONES.....	50
BIBLIOGRAFÍA	50



LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Curva patrón de calibración con AIA sintético.....	36
Fig. 2. Inoculación de rizobacterias en semillas de A). <i>Bucquetia glutinosa</i> . B). <i>Pentacalia pulchella</i>	38
Fig. 3. Diseño experimental de los experimentos de promoción del crecimiento vegetal en semillas de <i>B. glutinosa</i> y <i>P. pulchella</i> . R: Replicas; C: Control; T: Tratamientos.	39
Fig. 4. Medición de parámetros de crecimiento. A). Altura de la planta. B). Longitud de la raíz.....	40
Fig. 5. Recuento de bacterias heterótrofas aisladas en los suelos de las diferentes coberturas vegetales en el páramo de Rabanal.	42
Fig. 6. Índice de solubilización de fosfatos reportado en las rizobacterias aisladas en el páramo de Rabanal. La misma letra sobre los puntos indica que no hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) según la prueba de rango múltiple de Tukey. C. Neg: Control Negativo. C. Pos: Control Positivo.	43
Fig. 7. Producción de ácido 3-indol acético (AIA) por las rizobacterias aisladas en el páramo de Rabanal. La misma letra sobre los puntos indica que no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) según la prueba de rango múltiple de Tukey. C. Neg: Control Negativo. C. Pos: Control Positivo.....	44
Fig. 8. Efecto de la inoculación de las diferentes rizobacterias sobre la germinación de semillas de A. <i>B. glutinosa</i> , B. <i>P. pulchella</i> , en condiciones de invernadero. C: Control; T: Tratamientos.	45



LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Propiedades fisicoquímicas de los suelos muestreados en las diferentes coberturas vegetales del páramo de Rabanal.	41
Cuadro 2. Efecto de la inoculación en invernadero de las diferentes rizobacterias sobre el crecimiento y desarrollo en plantas de <i>B. glutinosa</i> y <i>P. pulchella</i>	45



CAPITULO I.

LOS PÁRAMOS Y LOS SUELOS: PROBLEMÁTICA ACTUAL

INTRODUCCIÓN

Para Cuatrecasas (1958), los páramos son regiones ubicadas por encima del bosque altoandino a más de 3000 m de altura, que se caracterizan por presentar altos niveles de radiación y humedad, temperaturas bajas con presencia de neblina y vegetación de tipo arbustivo a herbáceo.

Es el hábitat y sustento tanto de poblaciones indígenas como locales, siendo importante por su alta diversidad, presencia de endemismos, por ser retenedores y reguladores del ciclo hidrológico y también por almacenar grandes cantidades de carbono orgánico en sus suelos Hofstede *et al.*, (2003).

Colombia es uno de los países que posee la mayor área de páramos en los andes tropicales con cerca de 1.925.410 ha (Rivera & Rodríguez, 2011), de las cuales el departamento de Boyacá cuenta con unas 560.000 ha, que equivalen al 24% del total de los páramos del país, con los complejos de páramos de Cocuy Iguaque Merchan, Guantiva La Rusia, Pisba, Tota Bijagual Mamapacha y comparte con el departamento de Cundinamarca el complejo Páramo de Rabanal y Rio Bogotá (Morales *et al.*, 2007).

El páramo de Rabanal, ubicado en el altiplano cundiboyacense es uno de los proveedores más importantes del recurso hídrico en esta zona del país, abasteciendo diferentes cuerpos de agua como el embalse de Teatinos, el cual proporciona agua al municipio de Tunja (CORPOCHIVOR, 2014). Cabrera & Ramírez (2014), han reportado que el recurso hídrico de esta zona se está viendo afectado por la destrucción de las zonas de captación y recarga de acuíferos, como también por la alta demanda de este recurso.

Actualmente, este ecosistema está sufriendo una serie de transformaciones, generadas principalmente por actividades agropecuarias, ganaderas y mineras



(Useche & Márquez, 2015), donde el uso de maquinaria, la aplicación de abonos y pesticidas son unas de las principales causas de la pérdida de la vegetación nativa (Vargas, 2013), la biodiversidad, propiedades y funciones de los suelos (Fichtner *et al.*, 2014; Useche & Márquez, 2015).

Ante esta problemática, se han implementado estrategias de protección en estos ecosistemas, donde la propagación de especies nativas es una de las técnicas más usadas (Cardona, 2008; Barrera *et al.*, 2010; Vargas, 2011). Pero como se ha informado en varias investigaciones para que estas prácticas tengan éxito, es necesario conocer las condiciones en las que se encuentran los suelos en cuanto a los nutrientes y microbiota (SER, 2004). Con la implementación del Plan Nacional de Restauración (MADS, 2013), ha surgido el interés de usar técnicas de restauración ecológica en ecosistemas degradados donde se involucren los parámetros biológicos, físicos y químicos, los cuales pueden ser claves en la producción, crecimiento y desarrollo de las plantas (Cabrera & Ramírez, 2014).

Algunos autores como Singh *et al.*, (2011), Ahkami *et al.*, (2017) y Michaelis & Diekmann, (2018) mencionan que el uso de técnicas como la inoculación de plantas con microorganismos rizosféricos puede favorecer procesos como la solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno, asimilación del hierro o producir sustancias estimulantes del crecimiento vegetal como el ácido indolacético (AIA).

A pesar de lo anteriormente planteado, aún es muy escasa la información que se tiene sobre el efecto de la inoculación de estos microorganismos con especies nativas de páramo. Los pocos trabajos que existen, se han centrado en géneros vegetales como *Baccharis*, *Ageratina*, *Viburnum* y *Vallea*, debido a que estas plantas son de amplia distribución en ecosistemas de páramo y también porque han sido consideradas importantes por su rápido crecimiento en procesos destinados a la restauración ecológica (Acero-Nitola & Cortés-Pérez, 2015; Hernández-Pineda *et al.*, 2015; Ávila-Martínez *et al.*, 2015).



El suelo y su importancia en los ecosistemas

En los diferentes ecosistemas que posee el planeta Tierra, los suelos son los que albergan la mayor diversidad de organismos, debido principalmente a la variedad ilimitada de nutrientes y amplia gama de condiciones ambientales que estos encuentran en el suelo. Dentro de un pequeño parche de suelo, puede haber áreas de aireación, anóxicas, variaciones en el pH, temperaturas, condiciones húmedas y secas, macro y micro hábitats, concentraciones localizadas de nutrientes disueltos, sustratos orgánicos y variedad de organismos, los cuales tienden a concentrarse en zonas de condiciones favorables, en lugar de distribuirse uniformemente en todo el suelo. Además, el suelo proporciona diversidad espacial y un alto grado de aislamiento genético, lo que ayuda a explicar por qué los suelos contienen muchas más especies de organismos que los ambientes acuáticos (Brady & Weil, 2016).

La mayoría de los ecosistemas en el mundo se están viendo afectados por los diferentes procesos que se desarrollan en el suelo, tales como la compactación, degradación y la erosión, etc., lo cual genera en gran medida el aumento de los efectos del cambio climático, contaminación de fuentes hídricas, disminución de la biodiversidad de plantas y animales, reducción de las tasas de mineralización, contenidos de carbono orgánico, nitrógeno y de las comunidades microbianas del suelo, así mismo se puede presentar un efecto negativo en la productividad de los cultivos (Dangi *et al.*, 2012). Pero, a largo plazo se seguirá dependiendo del suelo como fuente de alimento y materias primas para suplir las necesidades del ser humano (Abbasi, 2005; Marschner & Rengel, 2007; Brady & Weil, 2016).

Propiedades y procesos ecosistémicos del suelo

La degradación de los suelos, es el resultado de una serie de disturbios generados por el cambio en el uso de los mismos, lo cual puede ocasionar una pérdida irreversible de los atributos físicos, químicos, biológicos y ecológicos (Lal, 2015), como también alteraciones en la proporción de los macro-agregados y disminución de su estabilidad, pudiendo actuar como un factor limitante en la recuperación ecológica de las propiedades y funciones ecosistémicas de los



suelos (Muñoz-Rojas *et al.*, 2016; Acar *et al.*, 2018). Estas funciones pueden estar estrechamente relacionadas con las propiedades del suelo, ya que estas pueden llegar a determinar la biota del suelo, los ciclos de los nutrientes y la composición florística de un lugar, así como también pueden alterar las condiciones de fertilidad, productividad y composición de los ecosistemas (Bardgett, 2005; Bardgett & Van der Putten, 2014; Lal, 2015).

En relación a los suelos de páramos, las transformaciones que ocurren en la superficie del suelo, principalmente cambios en las coberturas vegetales y los diferentes usos del suelo, generados principalmente por la intervención del ser humano, son algunas de las actividades más comunes que pueden llegar a tener efectos negativos a nivel de la diversidad biológica, cambio climático global, degradación del suelo y detrimento de los servicios ecológicos (Muñoz & Pérez, 2018; Barbosa-Castillo *et al.*, 2019).

En las últimas décadas se han ido buscando acciones correctivas que permitan rehabilitar el potencial original de los suelos afectados en cuanto a la calidad edáfica y la productividad (Rey-Benayas *et al.*, 2009; Aronson *et al.*, 2010). Estas gestiones están orientadas en tratar de mitigar el cambio climático global, la repoblación forestal y la restauración de tierras agrícolas degradadas, por medio de un cuerpo teórico robusto vinculado a las prácticas de restauración ecológica que cada día son más sofisticadas (Murcia *et al.*, 2016; Clewell & Aronson, 2017).

La restauración ecológica ha encaminado su trabajo a la recuperación de la estructura, función y composición de ecosistemas perturbados principalmente por la acción del hombre, el cual a lo largo del tiempo ha generado diferentes daños en la estructura física del suelo, a través de la alteración de los agregados, reducción de las reservas de carbono orgánico, pérdida de la diversidad biológica y los ciclos de nutrientes (Palmer *et al.*, 2016; Gatica-Saavedra *et al.*, 2017; Dorado & Arias, 2018).

Con la implementación de procesos de restauración ecológica se pueden alterar las propiedades físicas del suelo, por medio de la creación de macro y microagregados, los cuales pueden aumentar los niveles de acumulación de



carbono orgánico en el suelo; también con estos procesos se pueden generar impactos en las propiedades fisicoquímicas del suelo, capacidad de intercambio catiónico (CIC), actividad microbiana, biodisponibilidad de nutrientes y en la capacidad de retención de agua (Wang *et al.*, 2011; Muñoz-Rojas *et al.*, 2016; Rosenzweig *et al.*, 2016).

El uso de indicadores para medir la calidad del suelo, puede ser una estrategia efectiva para conocer la viabilidad de los proyectos de restauración ecológica (Costantini *et al.*, 2015), pero analizar estos indicadores no es fácil, ya que, aunque son simples y robustos, no tienen la capacidad de suministrar la información suficiente para abordar el estado del suelo y su trayectoria de cambio a corto plazo (Gonzales-Quiñones *et al.*, 2011). Algunos de los parámetros que se utilizan actualmente para medir la calidad o funcionalidad del suelo son los factores físicos y químicos, dejando a un lado a los biológicos (Muñoz-Rojas *et al.*, 2016). Es por esto que, para tener éxito en todo proceso de restauración ecológica, se deben integrar las propiedades físicas, químicas y de importancia biológica del suelo, como la biomasa, actividad y composición microbiana (Mukhopadhyay *et al.*, 2014).

La densidad aparente, la textura y la estructura del suelo son indicadores físicos de gran importancia, debido a que están relacionados con la capacidad de retención de agua y el desarrollo de raíces, siendo esenciales para la supervivencia de las comunidades de plantas durante sequías prolongadas (Gatica-Saavedra *et al.*, 2017). Así mismo, las propiedades químicas del suelo, como el pH, la conductividad eléctrica, el carbono orgánico, el nitrógeno y otros nutrientes son importantes al estar asociados con la fertilidad del suelo, y los niveles adecuados de estos parámetros son importantes para el establecimiento y la supervivencia de las plantas (Brevik *et al.*, 2015). A pesar de esto, el uso de indicadores microbiológicos, es mucho más complejo, ya que son más sensibles a las de las perturbaciones que las propiedades físicas y químicas, por lo tanto, es importante incorporarlos en programas de restauración (Raiesi & Beheshti, 2015).



En este sentido, la actividad y diversidad microbiana son determinantes en la sostenibilidad de las comunidades vegetales, ya que pueden ser capaces de mantener las funciones vitales del suelo, como el ciclo de nutrientes y del carbono (Brevik *et al.*, 2015). Además, la biomasa, la abundancia, la actividad y la estructura microbiana del suelo pueden ser buenos indicadores para evaluar la funcionalidad del suelo (Muñoz-Rojas *et al.*, 2016).

Microorganismos del suelo y su papel como promotores de crecimiento vegetal

La producción agrícola depende en gran medida de los fertilizantes químicos, los cuales proporcionan nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas como el fósforo, nitrógeno y el potasio. A pesar de esto, el uso excesivo de estos fertilizantes, puede generar impactos negativos en el medio ambiente (Chiew *et al.*, 2015).

Para disminuir el uso de estos fertilizantes, actualmente se vienen buscando estrategias que mejoren la productividad y el crecimiento de los cultivos, como las prácticas de gestión sostenible (Ubertino *et al.*, 2016), el uso de cultivos genéticamente modificados (Passari *et al.*, 2016), o la implementación de microorganismos para promover el crecimiento de las plantas (Pérez *et al.*, 2016, Kumar, 2016), más conocidos como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) (Bhardwaj *et al.*, 2014), las cuales habitan la rizosfera, que es la región del suelo donde se realizan los procesos mediados por los microorganismos y las raíces de las plantas (Santoyo *et al.*, 2016).

Las PGPR tienen la capacidad de mejorar el crecimiento de las plantas a través de procesos como la fijación biológica de nitrógeno, solubilización de fosfatos, disminución del estrés biótico y abiótico, producción de fitohormonas y sideróforos (Gouda *et al.*, 2018). Pese a esto, el modo de acción de las diferentes PGPR varía según el tipo de huésped (García *et al.*, 2015), genotipo de las plantas, etapas de desarrollo, composición del suelo y condiciones climáticas (Vacheron *et al.*, 2013).



Actualmente el uso de inoculantes que contengan PGPR ha tomado gran importancia, ya que la utilización exitosa de esta práctica permite reducir o incluso eliminar el uso de fertilizantes sin pérdidas en el rendimiento del cultivo. Además, los inoculantes microbianos pueden ofrecer una alternativa más barata que el uso de fertilizantes para los pequeños agricultores (Bach *et al.*, 2016).

Dentro de este grupo de microorganismos se destacan los géneros *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Microbacterium*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces*, etc., los cuales pueden actuar como inóculos bacterianos y facilitar en gran medida el crecimiento de las plantas y aumentar el rendimiento de numerosos cultivos de interés agrícola (Santoyo *et al.*, 2016; Numan *et al.*, 2018).

ANTECEDENTES

Según el IDEAM (2013), durante los años 2011 y 2012 Colombia sufrió una acelerada pérdida de ecosistemas nativos, donde la deforestación y las diferentes actividades humanas fueron las responsables de tal problemática. Uno de estos ecosistemas, fue el páramo, el cual ha sido intervenido en más del 50% por el hombre (Garavito-Rincón, 2015).

Para el caso del páramo de Rabanal, este ecosistema viene sufriendo diferentes tipos de intervención, siendo el cultivo de papa, la ganadería, la plantación de especies exóticas y la minería factores que más ha contribuido a su transformación (Morales *et al.*, 2007; Riveros, 2009; Vargas, 2011). Además, estas actividades han generado la pérdida irreversible de las coberturas boscosas nativas y la creación de áreas abiertas, con fines agrícolas y ganaderos (Vargas, 2013), que junto con los incendios forestales, introducción de especies exóticas (Cabrera & Ramírez, 2014), construcción de vías y obras de infraestructura han generado la transformación del paisaje, incidiendo fuertemente en una alteración profunda del suelo (Vargas, 2013).



Ante esta problemática, actualmente se han implementado estrategias enfocadas a la recuperación de ecosistemas degradados, donde la siembra de plantas nativas de interés ecológico es una de las iniciativas más usadas; otras se enfocan solo en las propiedades de los suelos, mientras que unas pocas están incorporando microorganismos como indicadores en procesos de recuperación de áreas degradadas y calidad de los suelos (Vargas, 2011; Murcia *et al.*, 2016).

Según Vargas (2011), antes de empezar un proceso de restauración en áreas degradadas, hay que conocer la vegetación del lugar y realizar una buena selección de las plantas según los rasgos funcionales de cada especie, ya que de esto depende el éxito de los proyectos. Especies de los géneros *Ageratina*, *Baccharis*, *Vallea* y *Viburnum* han sido empleadas en proyectos de restauración ecológica para la recuperación de pastizales, debido a su rápido crecimiento (Acero-Nitola & Cortés-Pérez, 2015; Hernández-Pineda *et al.*, 2015). Otras, como *Bucquetia* y *Pentacalia* han sido empleadas en procesos de revegetación (Vargas, 2008; Diaz-Santamaria & Torres-Torres, 2017), desconociéndose aún, si estas plantas tienen la capacidad de generar asociaciones simbióticas con los microorganismos del suelo.

Para Colombia, los estudios donde se implementan microorganismos del suelo en ecosistemas de páramo son reducidos. Las pocas investigaciones que existen, se han enfocado en el aislamiento de bacterias heterótrofas y oligotróficas en el páramo de la Cortadera (Hernández-Velandia & Lizarazo-Forero, 2015), cuantificaron de poblaciones de hongos rizosféricos y comunidades bacterianas, en los páramos de Guasca y Cruz Verde (Arias & Piñeros, 2008; Benavides & Hermida, 2008), aislamiento de hongos solubilizadores de fosfato y bacterias fijadoras de nitrógeno en el páramo de Guerrero (Moratto *et al.*, 2005) y el aislamiento de bacterias y hongos cultivables, como también microorganismos celulolíticos y endomicorrizas presentes en la hojarasca de bosque en este mismo páramo (Bernal *et al.*, 2006).

En Cuanto al páramo de Rabanal, se han aislado microorganismos pertenecientes a los grupos funcionales implicados en los ciclos del C, N y P,



que estaban asociados a zonas de incendios (Beltrán-Pineda & Lizarazo-Forero, 2013). Además, hongos solubilizadores de fosfato (Beltrán-Pineda, 2014a), poblaciones de microorganismos solubilizadores de fosfato asociados al cultivo de papa (Beltrán-Pineda, 2014b) y bacterias celulolíticas aisladas de tres bosques nativos diferentes, fincas productoras de cereales y composteras (Viteri-Flórez et al., 2016).

En relación con el uso de bacterias promotoras de crecimiento vegetal, la mayoría de las investigaciones, se realizan en cultivos agrícolas, como una alternativa para disminuir la fertilización química, principalmente en cultivos de papa y maíz (Román *et al.*, 2013), maracuyá (Murcia-Linares & Cruz-Bustos, 2017), arroz (Flórez-Márquez *et al.*, 2017) y arándano (Ortiz-Galeana *et al.*, 2018). Mientras que otras pocas se enfocan en plantas forestales como *Pinus patula* (Orozco-Jaramillo & Martínez-Nieto, 2009), *Weinmannia tomentosa* y *Escallonia myrtilloides* (Martínez-Nieto & García-González, 2010), *Quercus humboldtii* (Monroy & Lizarazo-Forero, 2010), *Eucalyptus sp.*, (Angulo *et al.*, 2014), en donde se han aislado bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, siendo las cepas más abundantes en la rizosfera y las que generan una mayor promoción del crecimiento. Así mismo, el género *Azospirillum* ha mostrado resultados favorables en el incremento de los porcentajes de germinación y el desarrollo de plantas de uso forestal como *Eucalyptus sp.*, (Castellanos *et al.*, 2010) y *Cedrela odorata* (Aguirre-Medina *et al.*, 2014).

Estudios como el de Ávila-Martínez *et al.*, (2015), reportan que las rizobacterias son importantes en programas de restauración ecológica, debido a que pueden incrementar las tasas de germinación y crecimiento por medio de la solubilización de compuestos como el P. Lizarazo-Medina & Gómez-Vásquez (2015), señalan que las bacterias y los hongos que tienen la capacidad para solubilizar fosfatos, fijar nitrógeno y degradar la materia orgánica, siendo importantes en procesos de restauración de suelos en lugares que han sido destruidos por las actividades antrópicas.



Teniendo en cuenta lo anterior, surge la necesidad de realizar un aporte al conocimiento referente al uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal en especies nativas en ecosistemas de páramo, especialmente en el departamento de Boyacá, y para esto se da respuesta a la pregunta de investigación:

- ¿Cuál es el efecto de la inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento sobre especies de plantas nativas de importancia en procesos de restauración ecológica en el páramo de Rabanal?

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la respuesta de *Bucquetia Glutinosa* (L. F.) DC y *Pentacalia Pulchella* (Kunth) Cuatrec., a la inoculación en vivero de rizobacterias promotoras de crecimiento aisladas en el Páramo de Rabanal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar bioquímica y molecularmente las rizobacterias con mayor capacidad de producción de ácido indol-acético (AIA) y solubilización de fosfatos en condiciones *in vitro*.
- Evaluar los efectos de la inoculación de diferentes géneros de rizobacterias sobre el crecimiento y desarrollo de *Bucquetia Glutinosa* (L. F.) DC y *Pentacalia Pulchella* (Kunth) Cuatrec., en condiciones de vivero.

PRODUCTOS DERIVADOS DE ESTE TRABAJO

Hernández-Velandia, D.R. & Lizarazo-Forero, L.M. (2018). Resultados preliminares de la respuesta de plantas nativas a la inoculación en invernadero de rizobacterias aisladas en el páramo de Rabanal. Ponencia oral. Segundo Encuentro Internacional de Investigación Universitaria.



BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi, R. (2005). Effects of different land-use types on soil quality in the hilly area of Rawalakot Azad Jammu and Kashmir. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science*, 55(3):221-228.
- Acar, M., Celik, I. & Günal, H. (2018). Effects of long-term tillage systems on aggregate-associated organic carbon in the eastern Mediterranean region of Turkey. *Eurasian Journal of Soil Science*, 7(1):51-58.
- Acero-Nitola, A. & Cortés-Pérez, F.C. (2015). Propagation of native species from the basin of La Vega River, Tunja, Boyacá, with potential for ecological restoration. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Exact. Fis. Nat*, 38(147):195-205.
- Aguirre-Medina, J., Mina-Briones, F., Cadena-Iñiguez, J., Dardón-Zunun, J. & Hernández-Sedas, D. (2014). Crecimiento de *Cedrela odorata* L. Biofertilizada con *Rhizophagus intraradices* y *Azospirillum brasilense* en vivero. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 20(3):177-186.
- Ahkami, A., White, R., Handakumbura, P. & Jansson, C. (2017). Rhizosphere engineering: enhancing sustainable plant ecosystem productivity. *Rhizosphere*, 3:233-243.
- Angulo, V., Sanfuentesa, E., Rodríguez, F. & Sossa, K. (2014). Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Rev Argent Microbiol*, 46(4):338-347.
- Arias, E. & Piñeros, P. (2008). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los Páramos de Guasca y Cruz Verde (Tesis de pregrado). Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Aronson, J., Blignaut, J., Milton, S., Le-Maitre, D., Esler, *et al.* (2010). Are socioeconomic benefits of restoration adequately quantified? A meta-analysis of recent papers (2000–2008) in restoration ecology and 12 other scientific journals. *Restoration Ecology* 18:143–154.
- Ávila-Martínez, E., Lizarazo-Forero, L. & Cortés-Pérez, F. (2015). Promoción del crecimiento de *Baccharis macrantha* (Asteraceae) con bacterias solubilizadoras de fosfatos asociadas a su rizosfera. *Acta biol. Colomb*, 20(3):121-131.
- Bach, E., dos Santos Seger, G., de Carvalho Fernández, G., Lisboa, B. & Passaglia, L. (2016). Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. *Applied soil ecology*, 99:141-149.



- Bhardwaj, D., Ansari, M., Sahoo, R., & Tuteja, N. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial cell factories*, 13(1):66.
- Barbosa-Castillo, C., Cruz-Argüello, S., Ramírez-Aguilera, D., Salazar Holguín, F., Ville-Triana, J., *et al.* (2018). Transformación y cambio en el uso del suelo en los páramos de Colombia en las últimas décadas. IDEAM, pp. 210-333.
- Bardgett, R. (2005). The biology of soil: a community and ecosystem approach. Oxford University Press. 242 p.
- Bardgett, R.D. & Van der Putten, W.H. (2014). Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature*, 515, 505–511.
- Barrera, J., Contreras, S., Garzón, N., Moreno, A. & Montoya, S. (2010). Manual para la restauración ecológica de los ecosistemas disturbados del distrito capital. Primera Edición. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Beltrán-Pineda, M. (2014a). Hongos solubilizadores de fosfato en suelo de páramo cultivado con papa (*Solanum tuberosum*). *Revista Ciencia en Desarrollo*, 5(2):145-154.
- Beltrán-Pineda, M. (2014b). Estudio comparativo de poblaciones microbianas totales y solubilizadoras de fosfato en suelos de páramo cultivados con papa (*Solanum tuberosum*) en Ventaquemada-Boyacá. *Investigación, innovación, ingeniería*, 2:56-74.
- Beltrán-Pineda, M. & Lizarazo-Forero, L. (2013). Grupos funcionales de microorganismos en suelos de páramo perturbados por incendios forestales. *Revista de Ciencias*, 17(2):121-136.
- Benavides, G. & Hermida, A. (2008). Aislamiento e identificación de flora bacteriana nativa de los páramos Cruz Verde y Guasca (Cundinamarca) (Tesis de pregrado). Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Bernal, E., Celis, S., Galindez, X., Moratto, C. & Garcia, D. (2006). Microflora cultivable y endomicorrizas obtenidas en hojarasca de bosque (Páramo Guerrero–Finca Puente de Tierra) Zipaquirá, Colombia. *Acta biol Colomb.* 11(2):125-130.
- Brady, N. & Weil, R. (2016): The nature and properties of soils. 15th Edition. Pearson Education Limited. England, Academic Press.
- Brevik, E., Cerdà, A., Mataix-Solera, J., Pereg, L., Quinton J., *et al.* (2015). The interdisciplinary nature of SOIL. *SOIL* 1:117–129.
- Cabrera, M. & Ramirez, Y. (2014). Restauración ecológica de los páramos de Colombia. Transformación y herramientas para su conservación. Instituto



- de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH).
Bogota, D.C. Colombia. 296 p.
- Cardona, A. (2008). Propagación vegetativa de cinco especies potencialmente importantes para la restauración ecológica del bosque altoandino. En: Vargas, O. (ed). Restauración ecológica del bosque altoandino. Estudios diagnósticos y experimentales en los alrededores del Embalse de Chisacá (Localidad de Usme, Bogotá D.C.): Universidad Nacional de Colombia, pp. 497-516.
- Castellanos, D., Burgos, L., Zabala, D., Botía, M. & Fernanda, M. (2010). Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, Cesar (Colombia). *Acta Biológica Colombiana*, 15(3):107-120.
- Chiew, Y., Spångberg, J., Baky, A., Hansson, P. & Jönsson, H. (2015). Environmental impact of recycling digested food waste as a fertilizer in agriculture. A case study. *Resources, Conservation and Recycling*, 95:1-14.
- Clewell, A. & Aronson, J. (2017). Restauración Ecológica: Principios, Valores y Estructura de una Profesión Emergente. Island Press. Segunda edición.
- Corporación autónoma regional de Chivor (CORPOCHIVOR). (2014). Actualización y socialización del plan de manejo ambiental para el distrito regional de manejo integrado (DRMI) páramo de Rabanal. 86 p.
- Costantini, E., Branquinho, C., Nunes, A., Schwilch G, Stavi, I., *et al.* (2015). Soil indicators to assess the effectiveness of restoration strategies in dryland ecosystems. *Solid Earth Discussions* 7:3645–87.
- Cuatrecasas, J. (1958). Aspectos de la vegetación natural de Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas Físicoquímicas y Naturales*, 10(2):221-264.
- Dangi, S., Stahl, P., Wick, A., Ingram, L. & Buyer, J. (2012): Microbial community recovery in reclaimed soils on a surface coal mine site. *Soil Sci. Soc. Am. J*, 76:915-924.
- Diaz-Santamaria, W. & Torres-Torres, C. (2017). Estudio básico de restauración vegetal en áreas de subpáramo degradadas de la vereda Monquentiva-Guatavita. Tesis Pegrado. Universidad Distrital Francisco José de Caldas.
- Dorado, O. & Arias, D. (2018). Reforestar o restaurar para la recuperación ambiental. *Inventio, la génesis de la cultura universitaria en Morelos*, 2(3):34-38.



- Fichtner, A., Von Oheimb, G., Härdtle, W., Wilken, C. & Gutknecht, L. (2014). Effects of anthropogenic disturbances on soil microbial communities in oak forests persist for more than 100 years. *Soil Biology and Biochemistry*, 70:79-87.
- Flórez-Márquez, J., Leal-Medina, G., Ardila-Leal, L. & Cárdenas-Caro, D. (2017). Aislamiento y caracterización de rizobacterias asociadas a cultivos de arroz (*Oryza sativa* L.) del Norte de Santander (Colombia). *Agrociencia*, 51(4):373-391.
- Garavito-Rincón, L. (2015). Los páramos en Colombia, un ecosistema en riesgo. *Ingeniare*, (19):127-136.
- García, F., Menéndez, E. & Rivas, R. (2015). Role of bacterial bio fertilizers in agriculture and forestry. *AIMS Bioeng*, 2:183-205.
- Gatica-Saavedra, P., Echeverría, C. & Nelson, C. (2017). Ecological indicators for assessing ecological success of forest restoration: a world review. *Restoration ecology*, 25(6):850-857.
- Gonzales-Quiñones, V., Stockdale, E., Banning, N., Hoyle, F., Sawada, Y., et al. (2011). Soil microbial biomass: interpretation and consideration for soil monitoring. *Soil Research*, 49:287–304.
- Gouda, S., Kerry, R., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H. & Patra, J. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological research*, 206:131-140.
- Hernández-Pineda, L., Roa-Casas, O. & Cortés-Pérez, F. (2015). Crecimiento de *Baccharis macrantha* y *Viburnum triphyllum*, dos especies nativas útiles en restauración ecológica, plantadas en un pastizal andino (Boyacá, Colombia). *Biota Colombiana*, 15(2):27-38.
- Hernández-Velandia, D. & Lizarazo-Forero, L. (2015). Bacterias heterótrofas y oligotróficas en zonas conservadas e intervenidas del páramo de La Cortadera, Boyacá, Colombia. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 18(2):475-483.
- Hofstede, R., Segarra, P. & Vasconez, P. (2003). Los páramos del mundo. Global Peatland Initiative/ NC-IUCN/ Ecociencia. Quito. 299 p.
- Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM). (2013). Manual de usuario Apply Kalman Filter Linux. Grupo de Modelamiento de Tiempo y Clima. Subdirección de Meteorología IDEAM.
- Kumar, A. (2016). Phosphate solubilizing bacteria in agriculture biotechnology: diversity, mechanism and their role in plant growth and crop yield. *Int J Adv Res*, 4:116-124.



- Lal, R. (2015). Restoring soil quality to mitigate soil degradation. *Sustainability*, 7:5875–5895.
- Lizarazo-Medina, P. & Gómez-Vásquez, D. (2015). Microbiota rizosférica de *Espeletia* sp. de los Páramos de Santa Inés y de Frontino-Urrao en Antioquia, Colombia. *Acta Biol. Colomb*, 20(1):175-182.
- Marschner, P. & Rengel, Z. (2007): Nutrient cycling in terrestrial ecosystems. Springer- Verlag Berlin, 391 p.
- Martínez-Nieto, P. & García-González, D. (2010). Bacterias diazotroficas y solubilizadoras de fósforo aisladas de las especies forestales Altoandinas Colombianas *Weinmannia tomentosa* y *Escallonia myrtilloides*. *Intropica*, 5(1):63-76.
- Michaelis, J. & Diekmann, M. (2018). Effects of soil types and bacteria inoculum on the cultivation and reintroduction success of rare plant species. *Plant Ecol*, 219:441–453.
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (MADS). 2013. Plan Nacional de Restauración: restauración ecológica, rehabilitación y recuperación de áreas disturbadas. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. 80 p.
- Monroy, L. & Lizarazo-Forero, L. (2010). Identificación de hongos fitopatógenos asociados al roble (*quercus humboldtii* bonpl.), en Los Municipios De Encino (Santander), Arcabuco, Y Tipacoque (Boyacá). *Colombia Forestal*, 13(2):347-356.
- Morales, M., et al. (2007). Atlas de Páramos de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D. C. 208 p.
- Moratto, C., Martínez, L., Valencia, H. & Sánchez, J. (2005). Efecto del uso del suelo sobre hongos solubilizadores de fosfato y bacterias diazotróficas en el páramo de Guerrero (Cundinamarca). *Agronomía Colombiana*, 23(2): 299-309.
- Mukhopadhyay, S., Maiti, S. & Masto, R. (2014). Development of mine soil quality index (MSQI) for evaluation of reclamation success: a chronosequence study. *Ecological Engineering*, 71:10–20.
- Muñoz-Rojas, M., Erickson, T., Dixon, K. & Merritt, D. (2016). Soil quality indicators to assess functionality of restored soils in degraded semiarid ecosystems. *Restoration Ecology* 24: 43-52.
- Muñoz, F. & Pérez, E. (2018). Conflictos de uso de suelo en la frontera agrícola y áreas del páramo del municipio de Totoró, Cauca. *Suelos Ecuatoriales*, 47(1 y 2):10-17.



- Murcia-Linares, A. & Cruz-Bustos, S. (2017). Efecto de la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en maracuyá y badea cultivadas en condiciones de estrés hídrico. (Tesis de pregrado). Bogotá: Universidad de la Salle.
- Murcia, C., Guariguata, M., Andrade, Á., Andrade, G., Aronson, J. *et al.* (2016). Challenges and prospects for scaling-up ecological restoration to meet international commitments: Colombia as a case study. *Conservation Letters*, 9(3):213-220.
- Numan, M., Bashir, S., Khan, Y., Mumtaz, R., Shinwari, Z. *et al.* (2018). Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: a review. *Microbiological research*, 209:21-32.
- Orozco-Jaramillo, C. & Martínez-Nieto, P. (2009). Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno asimbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en Colombia. *Bosque*, 30:70-77.
- Ortiz-Galeana, M., Hernández-Salmerón, J., Valenzuela-Aragón, B., De los Santos-Villalobos, S., Rocha-Granados, M. & Santoyo G. (2018). Diversidad de bacterias endófitas cultivables asociadas a plantas de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. Biloxi con actividades promotoras del crecimiento vegetal. *Chilean J. Agric. Anim. Sci., ex Agro-Ciencia*, 34(2):140-151.
- Palmer, M., Zedler, J. & Falk, D. (2016). Ecological theory and restoration ecology. In *Foundations of restoration ecology*. Island Press, Washington, DC, pp. 3-26.
- Passari, A., Chandra, P., Mishra, V., Leo, V., Gupta, V., *et al.* (2016). Detection of biosynthetic gene and phytohormone production by endophytic actinobacteria associated with *Solanum lycopersicum* and their plant-growth-promoting effect. *Research in microbiology*, 167(8):692-705.
- Pérez, Y., Charest, C., Dalpé, Y., Séguin, S., Wang, X. & Khanizadeh, S. (2016). Effect of inoculation with Arbuscular Mycorrhizal fungi on selected spring wheat lines. *Sustainable Agriculture Research*, 5(526):2017-2645.
- Raiesi, F. & Beheshti, A. (2015). Microbiological indicators of soil quality and degradation following conversion of native forests to continuous croplands. *Ecological Indicators*, 50:173-185.
- Rey-Benayas, J., Newton, A., Diaz, A. & Bullock, J. (2009) Enhancement of biodiversity and ecosystem services by ecological restoration: a meta-analysis. *Science*, 325:1121–1124.



- Rivera, D. & Rodríguez, C. (2011). Guía divulgativa de criterios para la delimitación de páramos de Colombia. Bogotá. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. 68 p.
- Riveros, A. (2009). Elementos de una historia socioambiental para el macizo de Rabanal. Informe de práctica. 106 p.
- Román, N., Mamani, G. & García, D. (2013). Caracterización molecular de bacteria *Azospirillum* sp, *Azotobacter* sp y *Pseudomonas* sp. promotoras del crecimiento vegetal de cultivos de *Solanum tuberosum* y *Zea mays*. *PROSPECTIVA UNIVERSITARIA*, 10(1): 3-16.
- Rosenzweig, S., Carson, M., Baer, S. & Blair, J. (2016). Changes in soil properties, microbial biomass, and fluxes of C and N in soil following post-agricultural grassland restoration. *Applied soil ecology*, 100:186-194.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M. & Glick, B. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological research*, 183:92-99.
- Singh, J., Pandey, V. & Singh, D.P. (2011). Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 140:339–353.
- Society for Ecological Restoration International-Sociedad Internacional para la Restauración Ecológica (SER). (2004). Principios de SER International sobre la restauración ecológica. Sociedad Internacional para la restauración ecológica. Tucson, Arizona, Estados Unidos de América. 15 p.
- Ubertino, S., Mundler, P. & Tamini, L. (2016). The adoption of sustainable management practices by Mexican coffee producers. *Sustainable Agriculture Research*, 5(526):2017-2642).
- Useche, D. & Márquez, S. (2015). Diagnóstico socio-ambiental de la producción agrícola en el páramo de Rabanal (Colombia) como base para su reconversión agroecológica. *Ciencia y Agricultura*, 12(1):27-37.
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y. et al. (2013). Plant growth promoting rhizobacteria and root system functioning *Front. Plant Sci.*, 4(356):1-19.
- Vargas, O. (2008). Estrategias para la restauración ecológica del bosque altoandino. El caso de la Reserva Forestal Municipal de Cogua, Cundinamarca). En: Velasco-Linares, P. & Vargas, O. Problemática de los Bosques Altoandinos. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. p. 41-56.



- Vargas, O. (2011). Restauración ecológica: biodiversidad y conservación. *Acta Biológica Colombiana*, 16(2):221-246.
- Vargas, O. 2013. Disturbios en los páramos andinos. En: Cortés-Duque, J. & Sarmiento, C. (Eds). 2013. Visión socioecosistémica de los páramos y la alta montaña colombiana: memorias del proceso de definición de criterios para la delimitación de páramos. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D.C. Colombia.
- Viteri-Flórez, P., Castillo-Guerra, D. & Viteri-Rosero, S. (2016). Capacidad y diversidad de bacterias celulolíticas aisladas de tres hábitats tropicales en Boyacá, Colombia. *Acta Agron*, 65(4):362-367.
- Wang, Y., Fu, B., Lü, Y & Chen, L. (2011). Effects of vegetation restoration on soil organic carbon sequestration at multiple scales in semi-arid Loess Plateau, China. *Catena*, 85:58–66.



CAPITULO 2

RESPUESTA DE *Bucquetia glutinosa* (L. F.) DC y *Pentacalia pulchella* (Kunth) Cuatrec., A LA INOCULACIÓN CON RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO AISLADAS EN EL PÁRAMO DE RABANAL

RESUMEN

Los páramos han sido descritos por su alta biodiversidad, capacidad hídrica y por almacenar grandes cantidades de carbono orgánico en sus suelos, sin embargo, están siendo alterados por uso de maquinaria agrícola, la aplicación de fertilizantes y el pastoreo de ganado. Para tratar de revertir estos procesos de degradación, el uso de plantas nativas y bacterias promotoras de crecimiento puede ser una estrategia clave para mejorar la calidad del suelo, como también el desarrollo y el crecimiento de la vegetación. Por lo tanto, se hizo necesario conocer el efecto de la inoculación en plantas de *Bucquetia Glutinosa* (L. F.) DC y *Pentacalia Pulchella* (Kunth) Cuatrec., en condiciones de invernadero, usando rizobacterias promotoras de crecimiento que fueron aisladas en diferentes coberturas vegetales del páramo de Rabanal. Se realizaron pruebas de solubilización de fosfatos en medio PVK y producción de ácido indol-acético utilizando la solución indicadora de Salkowski, en donde solo el 73.3 % de las rizobacterias formaron halos de solubilización, mientras que el 93.3 % produjeron concentraciones diferentes de ácido indol-acético. Mediante la amplificación de la región 16s de rRNA, se pudo evidenciar que *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi* y *Pseudomonas* sp., fueron las rizobacterias que mostraron la mayor capacidad para solubilizar fosfatos y producir ácido indol-acético en condiciones *in vitro*, además promovieron la germinación, el crecimiento y el desarrollo de *Bucquetia glutinosa* y *Pentacalia pulchella*.

PALABRAS CLAVE: Páramo, rizobacterias, solubilización de fosfatos, ácido indol-acético, inoculación, plantas nativas.



INTRODUCCIÓN

Los páramos han sido reconocidos como ecosistemas de gran importancia gracias a su alta biodiversidad, por ser retenedores y reguladores del ciclo hídrico, como también por almacenar carbono orgánico en sus suelos (Hofstede *et al.*, 2003; Rivera & Rodríguez, 2011). No obstante, en las últimas décadas han venido presentando diferentes disturbios generados por la acción del ser humano (Sarmiento *et al.*, 2013; Muñoz & Pérez, 2018). En Boyacá, el páramo de Rabanal, es uno de los ecosistemas que está sufriendo, mayor pérdida de sus coberturas vegetales nativas y servicios ecosistémicos (Vargas, 2013), debido al uso de maquinaria agrícola y aplicación de fertilizantes para la producción de cultivos, al pastoreo de ganado y a las actividades mineras extractivas que se desarrollan en esta zona (CORPOCHIVOR, 2014; Useche & Márquez, 2015).

Con el fin de contrarrestar los impactos ecológicos negativos y ayudar a recuperar la biodiversidad, funciones y servicios ecosistémicos, unas de las estrategias que se vienen implementando en los procesos de restauración ecológica, es la revegetación con flora nativa (Barrera *et al.*, 2010; Bullock *et al.*, 2011; Vargas, 2011; Rey- Benayas & Bullock, 2012), donde se han usado diferentes especies como *Bucquetia glutinosa*, *Monochaetum myrtoideum* (Díaz *et al.*, 2008; Velazco-Linares *et al.*, 2008; Cardenas-Burgos, 2018), *Weinmannia tomentosa*, *Gaiadendron punctatum*, *Miconia ligustrina*, *Macleania rupestris*, *Pentacalia pulchella*, *Tibouchina grossa* (Montenegro & Vargas, 2008), *Xylosma spiculifera*, *Croton purdiei*, *Baccharis macrantha*, *Verbesina centroboyacana*, *Duranta mutisii*, *Lupinus bogotensis*, *Dodonaea viscosa* (Acero-Nitola & Cortés-Pérez, 2015), *Baccharis macrantha* y *Viburnum tryphyllum* (Ávila-Martínez *et al.*, 2015; Hernández-Pineda *et al.*, 2015). No obstante, este tipo de estrategias no han tenido el éxito esperado, debido principalmente a factores como la sequía, los altos niveles de radiación y la deficiencia de nutrientes del suelo (Bullock *et al.*, 2011; Radhapriya *et al.*, 2014; Kasotia *et al.*, 2016).



Para tratar de remediar estos factores, en la actualidad se vienen desarrollando otro tipo de técnicas, en donde el uso de microorganismos rizosféricos puede ser clave para mejorar la calidad del suelo, como también el desarrollo y crecimiento de la vegetación (Bashan *et al.*, 2012; Ramachandran & Radhapiya, 2016; Vejan *et al.*, 2016). Estos microorganismos se conocen como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) (De-Bashan *et al.*, 2012; Fasciglione *et al.*, 2015; Santoyo *et al.*, 2016; Radhapiya *et al.*, 2018), las cuales tienen la capacidad para fijar nitrógeno, producir fitohormonas, solubilizar fosfatos y sintetizar sideróforos como estrategia para promover el crecimiento de las plantas (Berger *et al.*, 2015).

Diferentes estudios como los de Agbodjato *et al.*, (2015) y Kuan *et al.*, (2016), en cultivos de maíz, papa (Román *et al.*, 2013), maracuyá (Murcia-Linares & Cruz-Bustos, 2017), arroz (Flórez-Márquez *et al.*, 2017) y arándano (Ortiz-Galeana *et al.*, 2018), han utilizado estos microorganismos para mejorar la producción de sus cosechas. Otros han demostrado que el uso de PGPR como *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Azospirillum* y *Serratia* mejoran el crecimiento y la disponibilidad de nutrientes, aceleran el desarrollo de brotes y raíces, aumentan el número de ramas y mejoran las tasas de supervivencia de las plantas (Castellanos *et al.*, 2010; Bashan *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013; Aguirre-Medina *et al.*, 2014; Ramachandran & Radhapiya, 2016; Radhapiya *et al.*, 2018).

Hoy en día, el uso de PGPR como inoculantes microbianos es una estrategia valiosa que se puede utilizar para reducir el uso de fertilizantes químicos y aumentar el éxito de los proyectos de restauración ecológica sin comprometer el rendimiento y la calidad de las plantas (Ahemad & Kibret, 2014; Vejan *et al.*, 2016; Finkel *et al.*, 2017). Por tal razón se hace necesario conocer el efecto de la inoculación de las rizobacterias promotoras de crecimiento aisladas en el Páramo de Rabanal sobre *Bucquetia Glutinosa* (L. F.) DC y *Pentacalia Pulchella* (Kunth) Cuatrec., en condiciones de invernadero.



MATERIALES Y MÉTODOS

Área de Estudio

El estudio se desarrolló en el páramo de Rabanal ubicado en la cordillera oriental, formando parte del complejo de páramos Rabanal-Río Bogotá; en jurisdicción del municipio de Ventaquemada, vereda Montoya, sector Matanegra, en el departamento de Boyacá (05°24'45.2"N y 73°32'29.7"W), entre los 3030 y los 3350 m de altitud. Este páramo tiene un régimen de lluvias bimodal, siendo los meses de marzo a julio y de octubre a noviembre los que presentan la mayor pluviosidad. Predomina la vegetación de tipo herbácea, con pequeños fragmentos de bosque altoandino con vegetación de estrato arbóreo que alcanzan los 12 m de altura. Presenta suelos con baja fertilidad, acumulación de aluminio y alta acidez; con contenidos altos de materia orgánica, gracias a los procesos de descomposición (Morales *et al.*, 2007; CORPOCHIVOR, 2014).

Además, esta zona del páramo hace parte del territorio de la cuenca del río Garagoa, con una extensión cartográfica de 6.640 ha. Lo conforman las veredas de Puente de Boyacá, Bojirque, Montoya (con los sectores de San José del Gacal y Matanegra), Estancia Grande, Parroquia vieja, Boquerón y una parte muy pequeña de Frutillo (CORPOCHIVOR, 2014).

Fase de Campo

Muestreo de Suelos

Se tomaron submuestras de raíces finas y suelo rizosférico hasta conformar una muestra compuesta de aproximadamente 1 Kg, en coberturas vegetales de bosque altoandino, plantación de acacias, arbustal y pastizal, siguiendo la metodología propuesta por Cline (1944). Las muestras se almacenaron en bolsas de cierre hermético y transportado en neveras portables al laboratorio del Grupo de Investigación Biología Ambiental, en el cual se tamizaron a 2 mm de poro y fueron refrigeradas a 4 °C para su análisis.

Para realizar los análisis fisicoquímicos del suelo de las diferentes coberturas del páramo, se tomaron muestras de aproximadamente 1 kg de suelo a 20 cm de



profundidad, por medio de un barreno manual con base a los lineamientos del laboratorio de suelos del Instituto Geográfico Agustín Codazzi – IGAC, (1990). Estas muestras fueron llevadas al laboratorio de suelos de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, donde se evaluaron parámetros como textura (método de Bouyoucus), cuantificación gravimétrica (método de Bouyoucus), pH (relación 1:1), CIC (acetato de amonio), conductividad eléctrica CE (extracto de saturación, conductivímetro), porcentaje de materia orgánica (método de Walkey - Black), fósforo disponible (método Bray II, calorimetría) y elementos mayores y menores (método de Abs. atómica).

Muestreo de semillas

Se efectuaron recorridos a lo largo del páramo de Rabanal, buscando plantas maduras y sanas de las especies vegetales *Bucquetia glutinosa* y *Pentacalia pulchella*. Una vez fueron ubicadas las fuentes semilleras, se colectaron las semillas maduras de forma directa, siendo almacenadas inmediatamente en bolsas de papel.

Posteriormente cada una de las semillas fueron depositadas en recipientes con agua durante una hora, después de esto, se descartaron aquellas que flotaron. Las semillas seleccionadas, fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 3% durante tres minutos, luego de esto se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril para eliminar los excesos de la solución (Murillo- Amador *et al.*, 2000).

Fase de laboratorio

Aislamiento y cuantificación de bacterias heterótrofas y solubilizadoras de fosfatos

A partir de las muestras tomadas en las diferentes coberturas vegetales, se pesaron 10 g de suelo, con el cual se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-4} con solución salina al 85%, y se inocularon 100 μ L por duplicado en los medios de cultivo Agar Trypticase de Soya -TSA- (Merck)[®], Agar King B (Pronadisa)[®] y Agar Pikovskaya-PVK-usando como fuente de P el fosfato tricalcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), suplementado con 0,1 g/L de purpura de bromocresol, como indicador de pH.



Los medios de cultivo TSA y King B fueron incubados a 30°C por 48 horas y los de PVK a 28°C por siete días.

Para el aislamiento de bacterias formadoras de esporas, las diluciones fueron sometidas a un choque térmico de 80°C durante 20 min, para luego ser sembradas por duplicado en el medio de cultivo agar CCY e incubadas a 30°C por 48 horas. Una vez culminado el tiempo de incubación, se realizó el recuento de las colonias, las cuales se expresaron como unidades formadoras de colonia por gramo de suelo (UFC/g⁻¹).

En cuanto a las bacterias solubilizadoras de fosfatos, se realizó el recuento de las colonias, con presencia de halo de solubilización y cambio de color purpura a naranja alrededor de la colonia, consideradas como potenciales solubilizadoras de fósforo (Bernal, 2010).

Para estimar la capacidad de solubilización de fosfatos, se midieron los halos producidos por cada una de las cepas en el medio PVK, calculando el índice de solubilización de fosfatos a partir de la fórmula (Kumar & Narula, 1999):

$$IS = \frac{A}{B}$$

Dónde:

A= Diámetro total (Diámetro de la colonia + Diámetro del halo)

B= Diámetro de la colonia

Para estos análisis se usó como control positivo la cepa de *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525), la cual ha sido reconocida como una de las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (Sivasakthi *et al.*, 2014), mientras que como control negativo se usó la cepa no promotora de crecimiento *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).



Rizobacterias productoras de ácido 3-indol acético (AIA)

Se ejecutó cuantitativamente por colorimetría utilizando la solución indicadora Salkowski preparada a partir de cloruro férrico en ácido sulfúrico (Glickmann y Deessaux, 1995; Mayer, 1958).

Los aislados bacterianos, el control positivo (*Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525) y el control negativo (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) fueron sembrados por triplicado en caldo Luria Bertani (CLB) suplementado con L-triptófano a una concentración de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e incubados en oscuridad a 28°C por 48 horas (Müller & Weiler, 2000). Posteriormente, fueron centrifugados a 3500 rpm por 20 minutos, para luego remover las células bacterianas del medio de cultivo (Fischer *et al.* 2007).

Se tomó 1 mL del sobrenadante de cada uno de los tubos y se mezcló con 4 mL de reactivo de Salkowski (Patten & Glick, 2002), llevando a incubación a temperatura ambiente por 30 min en condiciones de oscuridad. La lectura de la absorbancia se realizó por medio de un espectrofotómetro (Unico S2150) a una DO_{530} . Para conocer la producción total de AIA, se diseñó una curva patrón de calibración con AIA sintético (Sigma)[®] en concentraciones de 5 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, empleando como control absoluto caldo Luria Bertani suplementado con 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de L-triptófano (Fig. 1).

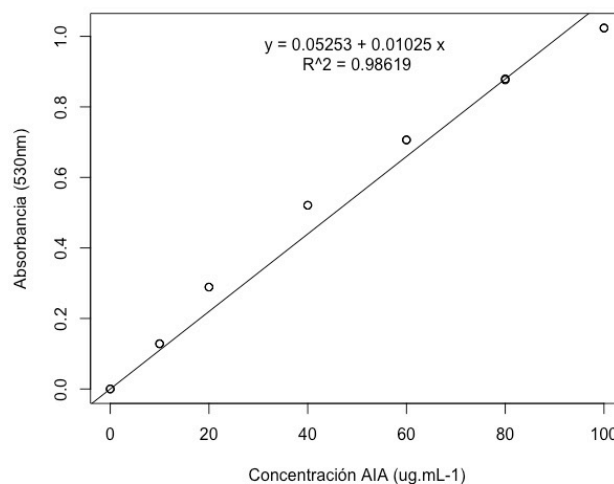


Fig. 1. Curva patrón de calibración con AIA sintético.



Identificación bioquímica y molecular de las rizobacterias

Las rizobacterias usadas en los ensayos de solubilización de fosfatos y producción de AIA, fueron repicadas en Agar TSA (Merck)[®] e incubadas por 24 horas, para su posterior identificación por medio de las pruebas bioquímicas comerciales API 20NE (Biomérieux)[®] y RapID NF Plus (Remel)[®] para no Enterobacterias, y BBL Crystal[®] para bacterias Gram positivas.

Se efectuaron pruebas moleculares mediante la amplificación de la región 16s de rRNA por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR-Polimerase Chain Reaction), empleando los primers universales 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Miller *et al.*, 2013). Con los resultados obtenidos en la identificación molecular de las rizobacterias, se realizó un análisis taxonómico de las secuencias siguiendo la metodología propuesta por Angulo *et al.* (2014), mediante comparación con las bases de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) y RDP (Ribosomal Database Project).

Preparación de los inoculantes

Se seleccionaron los aislados *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi* y *Pseudomonas* sp., las cuales presentaron la mayor capacidad para solubilizar fosfatos y producir AIA en condiciones *in vitro*. Estas bacterias fueron cultivadas en Agar TSA a 30°C durante 24 horas. Al término de este tiempo, fueron repicadas en caldo Luria Bertani (LB) (Garrido, 2007), e incubados hasta obtener suspensiones celulares de 10⁸ UFC/mL (Barquero *et al.*, 2015).

Para preparar el consorcio bacteriano, se usaron las cepas *Pseudomonas fluorescens* + *Pseudomonas fragi* + *Pseudomonas* sp, a las cuales se les realizó una prueba de compatibilidad en Agar TSA mediante la técnica de enfrentamiento dual, que consiste en trazar una estría de una de las cepas a enfrentar en una caja de petri, mientras que las otras cepas a examinar son sembradas perpendicularmente con respecto al cultivo inicial (Bautista *et al.*, 2007). Luego de esto, las cajas fueron incubadas a 30°C por 48 h. Al final del



período de incubación se pudo evidenciar que no se formaron áreas de inhibición entre las cepas.

Efecto de la inoculación en la germinación de *Bucquetia glutinosa* y *Pentacalia pulchella*

Para evaluar la promoción del crecimiento vegetal en *Bucquetia glutinosa* y *Pentacalia pulchella*, se implementaron en el invernadero de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, dos experimentos completamente al azar con 6 tratamientos y 3 réplicas para cada tratamiento. En total se usaron 900 semillas por especie, las cuales fueron sumergidas por separado en 7 mL de los inoculantes bacterianos a una temperatura de 30°C durante 60 minutos (Farina *et al.*, 2012) (Fig. 2).

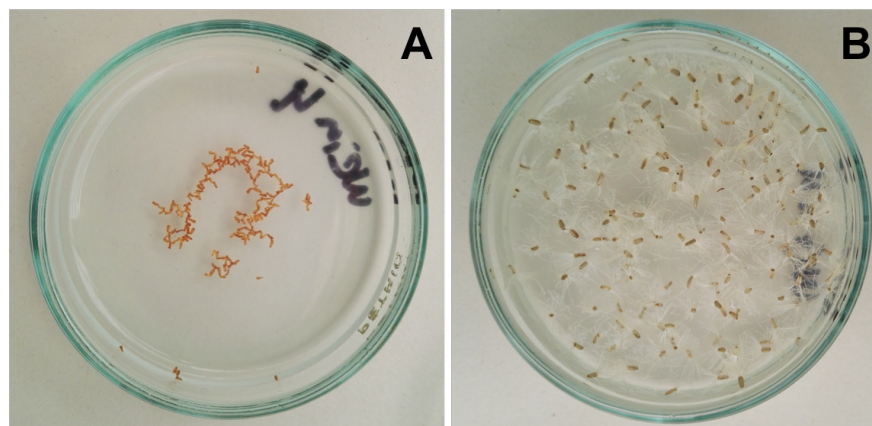


Fig. 2. Inoculación de rizobacterias en semillas de **A).** *Bucquetia glutinosa*. **B).** *Pentacalia pulchella*.

La disposición de cada uno de los tratamientos fue el mismo para ambos experimentos: (T1) suelo estéril + semillas inoculadas con *Pseudomonas fragi* (Wein4); (T2) suelo estéril + semillas inoculadas con *Pseudomonas fluorescens* (Wein6); (T3) suelo estéril + semillas inoculadas con por *Pseudomonas* sp. (Char1); (T4) suelo estéril + semillas inoculadas con cultivo mixto (*P. fragi* + *P. fluorescens* + *Pseudomonas* sp.); (T5) suelo estéril + semillas inoculadas con la cepa de referencia *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525) como control positivo, y por último el tratamiento Control (C) con suelo no estéril + semillas sin ningún tipo de inoculo (Fig. 3).



Como sustrato para la germinación de las semillas, se utilizó suelo del área de estudio debidamente esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 minutos, el cual fue depositado en bandejas de icopor desinfectadas previamente con alcohol al 70 %.

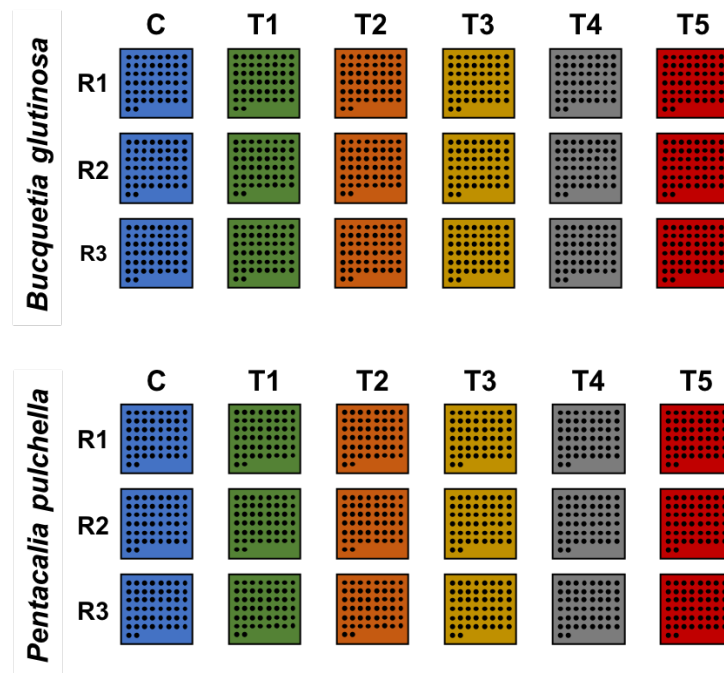


Fig. 3. Diseño experimental de los experimentos de promoción del crecimiento vegetal en semillas de *B. glutinosa* y *P. pulchella*. **R:** Replicas; **C:** Control; **T:** Tratamientos.

Medición de parámetros de crecimiento

Teniendo en cuenta la aparición del sistema radicular, se realizaron lecturas de cada uno de los tratamientos durante 49 días. El porcentaje de germinación (G) se determinó por medio de la ecuación propuesta por Araya *et al.*, (2000), que establece la relación entre el número de semillas germinadas y semillas sembradas, expresadas en porcentaje:

$$G = \left(\frac{\text{Semillas germinadas}}{\text{Semillas sembradas}} \right) \times 100$$

Después la germinación fueron trasplantadas al azar 30 plántulas de cada uno de los tratamientos (10 plantas por replica), en vasos de plástico de 9 onzas, a las cuales se les realizaron mediciones de la altura, tomada en centímetros



desde la base hasta la yema terminal de la rama más alta de la planta y estado fitosanitario, por 90 días (Fig. 4A) (Mohan & Radhakrishnan, 2012).



Fig. 4. Medición de parámetros de crecimiento. **A).** Altura de la planta. **B).** Longitud de la raíz.

La longitud de la raíz, el peso húmedo y seco fueron medidos al finalizar los 90 días. Para esto, la raíz de las plantas se lavó con agua de grifo, tratando de eliminar el suelo restante. La longitud radical se midió desde la base de la raíz hasta el punto de crecimiento más alto (Fig. 4B); el peso de materia húmeda y seca, se determinó por medio de la colecta de material vegetal de tallos con hojas y raíz. Cada planta fue pesada para determinar el peso húmedo. Posteriormente, las muestras fueron llevadas a un horno con circulación de aire forzado a 70°C durante 72 horas, y al cabo de este tiempo, se pesó nuevamente cada parte de la planta para determinar el peso seco, usando una balanza analítica (Mohan & Radhakrishnan, 2012; Yu *et al.*, 2012).

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados con el software R Studio versión 1.1.4, empleando análisis de varianza (ANOVA) para establecer diferencias estadísticamente significativas. La comparación de medias de cada uno de los análisis se llevó a cabo mediante la prueba de rango múltiple de Duncan, con un nivel de significancia de 0.05.



RESULTADOS

Análisis fisicoquímicos del suelo

Los suelos del área de estudio se caracterizaron por presentar texturas franco arenosas, con valores altos de materia orgánica (15.9–25.1 %), pH muy fuertemente ácido en el pastizal (4.6) y extremadamente ácido en las coberturas de bosque (4.2), plantación de acacias (3.9) y arbustal (4.3). En relación a las características químicas, se pudo evidenciar una deficiencia de nutrientes, como el fósforo (6.52 ppm), calcio (0.25 cmol+.Kg⁻¹), magnesio (3.95 cmol+.Kg⁻¹) y potasio (0.18 – 0.21 cmol+.Kg⁻¹), mientras que el hierro (118 ppm) y el aluminio (90 %) se reportaron en mayor proporción (Cuadro 1).

Cuadro 1. Propiedades fisicoquímicas de los suelos muestreados en las diferentes coberturas vegetales del páramo de Rabanal.

Zona	Textura	MO	Ca	Mg	K	pH	P	Fe	Mn	Cu	Zn	Al
		(%)	(cmol+.Kg ⁻¹)				(ppm)					(%)
Bosque	F. Arenosa	18,74	0.27	4.20	0.20	4.20	6.52	92.07	0.19	0.07	0.19	88.26
Pastizal	F. Arenosa	25.18	0.53	4.62	0.19	4.62	15.26	34.14	1.55	0.04	0.28	82.30
Arbustal	F. Arenosa	15.90	0.25	4.30	0.18	4.30	8.54	84.57	0.15	0.09	0.23	90.04
P. Acacias	F. Arenosa	20.49	0.41	3.95	0.21	3.95	6.58	118.00	0.30	0.01	0.28	86.90

Materia orgánica (MO), calcio (Ca), magnesio (Mg), potasio (K), fósforo (P), hierro (Fe), manganeso (Mn), cobre (Cu), zinc (Zn), aluminio (Al).

Cuantificación de bacterias heterótrofas

Se registraron densidades promedio de bacterias heterótrofas cultivables de 6.8 Log UFC/g⁻¹, donde la cobertura de bosque (7.4 Log UFC/g⁻¹), fue la que presentó el mayor recuento de microorganismos, seguido del pastizal (7.1 Log UFC/g⁻¹), plantación de acacias (6.6 Log UFC/g⁻¹) y el arbustal (6.2 Log UFC/g⁻¹), evidenciándose diferencias estadísticamente significativas ($p= 0.0004$) entre la concentración de bacterias y las coberturas vegetales (Fig. 5).

En total se aislaron 7 géneros bacterianos, entre los cuales, *Pseudomonas* (41.5 %), *Bacillus* (32.6 %), *Corynebacterium* (15.3 %) y *Acinetobacter* (3.8 %) fueron los géneros más abundantes en todas las coberturas vegetales, mientras que *Klebsiella* (3.6 %), *Enterobacter* (1.6 %), y *Micrococcus* (1.6 %) se aislaron en menor proporción en el pastizal y la plantación de acacias.

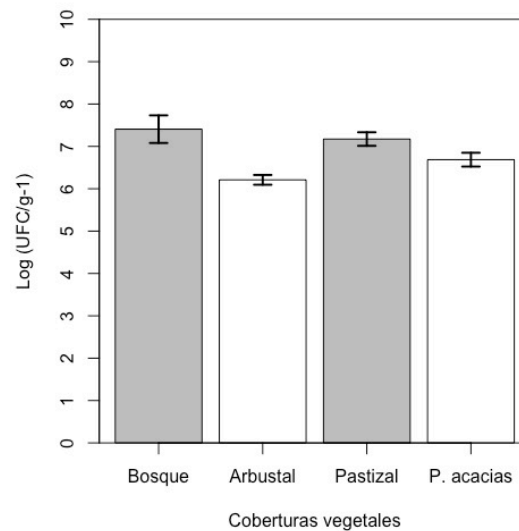


Fig. 5. Recuento de bacterias heterótrofas aisladas en los suelos de las diferentes coberturas vegetales en el páramo de Rabanal.

Identificación molecular de las rizobacterias

Los resultados de la identificación molecular de las tres (3) secuencias analizadas, muestran que estas pertenecen al género *Pseudomonas*, donde Wein6 corresponde a una *Pseudomonas fluorescens* con un porcentaje de identidad alto del ~99%, Wein4 a una *Pseudomonas fragi* (~99%) y Char1 a una *Pseudomonas* sp. (~99%), la cual no pudo ser identificada a nivel de especie, debido a que esta secuencia presento muchos gaps los cuales no permiten que el programa realice el análisis.

Solubilización de fosfatos en condiciones *in vitro*

Del total de bacterias aisladas (15), solo el 73.3 %, formaron halos de solubilización en el medio de cultivo PVK, con diámetros que varían entre >1–3 mm, evidenciándose que existen diferencias estadísticamente significativas ($p=0.0001$), en la capacidad de las bacterias para solubilizar fosfatos en condiciones *in vitro*.

Las bacterias *Pseudomonas fluorescens* (Wein6), *Pseudomonas* sp., (Char1), el consorcio bacteriano (*P. fragi* + *P. fluorescens* + *Pseudomonas* sp.) y la cepa *Pseudomonas fragi* (Wein 4) presentaron los índices de solubilización (IS) más altos (2.49, 2.26, 2.2 y 2.1 respectivamente), en comparación con los reportados



por el control positivo (*P. fluorescens*) con un IS de 1.63, mientras que *Bacillus* sp1., (Wein2) y los demás aislados registraron la menor capacidad de solubilización de fosfatos con IS entre 0 y 1.47 (Fig. 6).

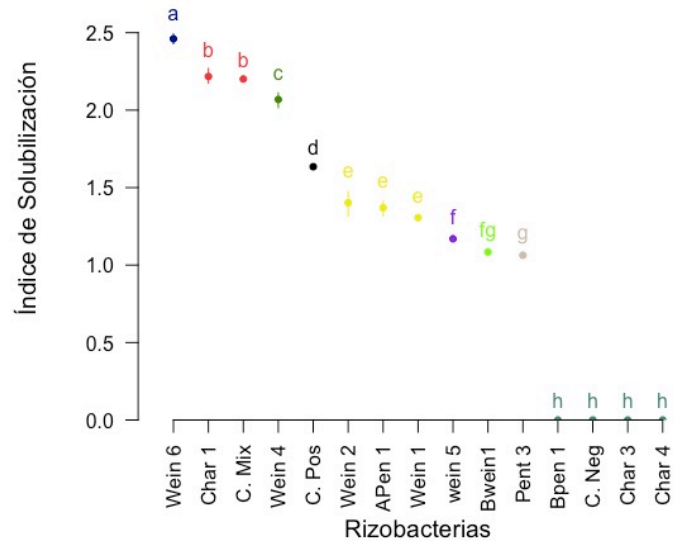


Fig. 6. Índice de solubilización de fosfatos reportado en las rizobacterias aisladas en el páramo de Rabanal. La misma letra sobre los puntos indica que no hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) según la prueba de rango múltiple de Tukey. **C. Neg:** Control Negativo. **C. Pos:** Control Positivo.

Producción de ácido 3-indol acético en condiciones *in vitro*

Se pudo evidenciar que el 93.3 % de las rizobacterias produjeron concentraciones estadísticamente diferentes ($p = 0,001$) de ácido indol acético (AIA), donde el 20 % de las bacterias, correspondiente a tres (3) aislados, produjo más del $60 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de AIA, el 53.3 % entre $20\text{-}50 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ y 26.6 % de los morfotipos bacterianos menos del $20 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$.

La bacteria que produjo la mayor cantidad de AIA en condiciones *in vitro* fue Char1 (*Pseudomonas* sp.) con $83.9 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, seguido de Wein6 (*P. fluorescens*) con $60.8 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de AIA y el control positivo (*P. fluorescens*) con $60.6 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. El consorcio bacteriano (*P. fragi* + *P. fluorescens* + *Pseudomonas* sp.) y los aislados bacterianos BWein1 (*Bacillus* sp2), Char3 (*Pseudomonas* sp2) y Wein4 (*P. fragi*) produjeron en promedio más de $35 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de AIA, mientras que los demás morfotipos bacterianos registraron una producción de AIA menor a los $30 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ (Fig. 7).

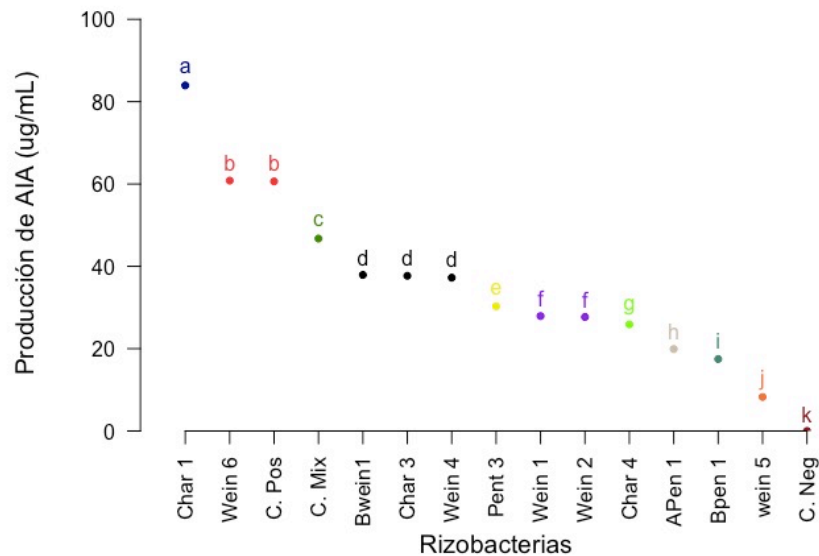


Fig. 7. Producción de ácido 3-indol acético (AIA) por las rizobacterias aisladas en el páramo de Rabanal. La misma letra sobre los puntos indica que no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) según la prueba de rango múltiple de Tukey. **C. Neg:** Control Negativo. **C. Pos:** Control Positivo.

Efecto de la inoculación en *Bucquetia glutinosa* y *Pentacalia pulchella*

Se observaron diferencias significativas ($p = 0,001$) en los porcentajes de germinación de las semillas de *Bucquetia glutinosa* y *Pentacalia pulchella*, cuando estas fueron inoculadas durante 28 días con *Pseudomonas fragi* (T1), *Pseudomonas fluorescens* (T2), *Pseudomonas* sp. (T3), el consorcio bacteriano (T4) *P. fragi* + *P. fluorescens* + *Pseudomonas* sp., y el control positivo *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 (T5), en comparación con los resultados obtenidos en el tratamiento control.

Además, se pudo evidenciar que las semillas de *B. glutinosa* inoculadas con el tratamiento T5 (control positivo) fueron las que presentaron los porcentajes de germinación más altos (72 %), seguido de los tratamientos T2 (*P. fluorescens*) con 67.3 %, T1 (*P. fragi*) con 66.6 %, T3 (*Pseudomonas* sp) con 66 % y T4 (*P. fragi* + *P. fluorescens* + *Pseudomonas* sp.) con 58.6%, mientras que los tratamientos T5 (control positivo) con 54.6 %, T1 (*P. fragi*) con 52.6 % y T4 (*P. fragi* + *P. fluorescens* + *Pseudomonas* sp.) fueron los que mostraron los mejores resultados de germinación en las semillas de *P. pulchella* (Fig. 8).

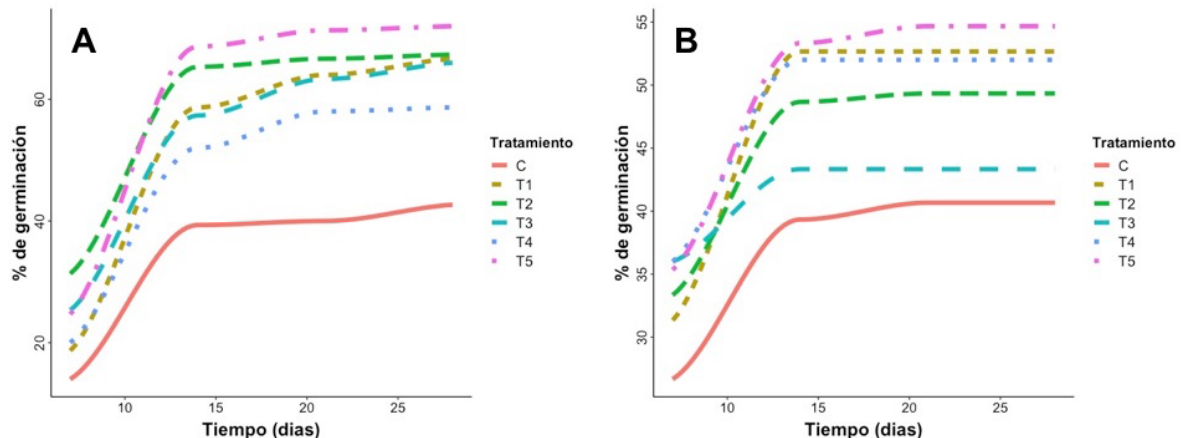


Fig. 8. Efecto de la inoculación de las diferentes rizobacterias sobre la germinación de semillas de **A.** *B. glutinosa*, **B.** *P. pulchella*, en condiciones de invernadero. **C:** Control; **T:** Tratamientos.

Como se observa en la Cuadro 2, se registraron diferencias significativas ($p=0.0004$) en la altura, longitud de la raíz y peso total de las plantas de *Bucquetia glutinosa* y *Pentacalia pulchella*. Los tratamientos T5 (control positivo), T2 (*P. fluorescens*) y T3 (*Pseudomonas* sp.), fueron los que reportaron las mayores alturas en las plantas de *Bucquetia glutinosa*, mientras que en *Pentacalia pulchella* fueron los tratamientos T2 (*P. fluorescens*) y T5 (control positivo).

La longitud máxima de la raíz y la producción de biomasa en las plantas de *Pentacalia pulchella*, fue promovida por la inoculación de las rizobacterias en los tratamientos T2 (*P. fluorescens*) y T3 (*Pseudomonas* sp.), mientras que en *Bucquetia glutinosa* fue afectada por T2 (*P. fluorescens*).

Cuadro 2. Efecto de la inoculación en invernadero de las diferentes rizobacterias sobre el crecimiento y desarrollo en plantas de *B. glutinosa* y *P. pulchella*.

T	Párametros evaluados					
	<i>Bucquetia glutinosa</i>			<i>Pentacalia pulchella</i>		
	A (cm)	LR (cm)	PT (g)	A (cm)	LR (cm)	PT (g)
T1	5.7 (± 0.43) b	11.5 (± 0.87) d	0.14 (± 0.02) d	8.1 (± 0.21) b	17.6 (± 1.87) c	0.18 (± 0.02) c
T2	6.47 (± 0.21) a	18.4 (± 0.43) a	0.28 (± 0.02) a	9.09 (± 0.45) a	27.3 (± 1.35) a	0.35 (± 0.03) a
T3	6.45 (± 0.23) a	14.3 (± 0.68) c	0.22 (± 0.01) c	6.48 (± 0.27) c	27.5 (± 0.76) a	0.37 (± 0.01) a
T4	2.3 (± 0.2) c	17.5 (± 0.34) b	0.25 (± 0.02) b	5.29 (± 0.41) d	25.1 (± 1.36) b	0.29 (± 0.05) b
T5	6.5 (± 0.36) a	17.3 (± 0.77) b	0.21 (± 0.04) c	9.49 (± 0.34) a	23.5 (± 1.30) b	0.34 (± 0.02) a
TC	1.7 (± 0.13) d	6.9 (± 0.36) e	0.09 (± 0.02) e	2.35 (± 0.28) e	10.26 (± 0.43) d	0.12 (± 0.02) d

($n=360$; los valores entre paréntesis hacen referencia a la desviación estándar). La misma letra indica que no hubo diferencias significativas ($p<0.05$) según la prueba de rango múltiple de Tukey. **T:** Tratamientos, **A:** Altura de la plántula, **LR:** Longitud de la raíz y **PT:** Peso total de la planta.



DISCUSIÓN

Análisis fisicoquímicos del suelo

Los suelos en estudio se caracterizaron por presentar texturas franco arenosas, contenidos altos de materia orgánica (15.9 - 25.1 %) y valores de pH fuertemente ácidos (pH 4.6) y extremadamente ácidos (pH 3.9), siendo similares a los reportados por Daza-Torres *et al.* (2014) en el páramo de Sumapaz (MO: 18 % y pH: 4.5), Hernández-Velandia & Lizarazo-Forero (2015) en el páramo de la Cortadera (MO: 8.2 % y pH: 4.3) y Beltrán-Pineda (2014) en suelos cultivados con papa (MO: 21 % y pH 5.2). Además, se pudo evidenciar una deficiencia de nutrientes como el P (6.52 ppm), Ca (0.25 cmol+.Kg⁻¹), Mg (3.95 cmol+.Kg⁻¹) y K (0.18 – 0.21 cmol+.Kg⁻¹), generada por las condiciones de acidez (pH 3.9 - 4.6) que presentaron estos suelos (Figueiredo *et al.*, 2015), así como también por el aumento de la concentración de aluminio (90 %), el cual puede alterar el metabolismo de las plantas e inhibir el crecimiento radical (Delgado & Gómez, 2016; Singh *et al.*, 2017).

Cuantificación de bacterias heterótrofas

Las abundancias promedio de bacterias heterótrofas cultivables que se registraron (6.8 Log UFC/g⁻¹), son altas si se comparan con los resultados reportados por Beltrán-Pineda (2014), para este mismo páramo (2.62 - 3.69 Log UFC/g⁻¹) y Lizarazo-Medina & Gómez-Vásquez (2015), en los páramos de Santa Inés (2,51x10⁵ UFC g⁻¹) y Frontino-Urrao (2,24x10⁵ UFC g⁻¹). Según Lauber *et al.* (2009), Chau *et al.* (2011), Tipayno *et al.* (2012) y Siciliano *et al.* (2014), la abundancia y diversidad de las comunidades microbianas, puede estar relacionada con la textura, materia orgánica y el pH del suelo, como también por el tipo de vegetación (Wardle *et al.*, 2012; Jassey *et al.*, 2013), lo cual puede estar relacionado con los resultados obtenidos en la cobertura de bosque donde se presentaron las mayores abundancias con 7.4 Log UFC/g⁻¹.

Pseudomonas (41.5 %) y *Bacillus* (32.6 %), se destacaron por ser los géneros más abundantes en las diferentes coberturas vegetales, resultados similares encontrados en suelos de páramo por otros estudios (Lizarazo-Medina &



Gómez-Vásquez, 2015; Hernández-Velandia & Lizarazo-Forero, 2015; Viteri *et al.*, 2016), asociados a la rizosfera de vainilla (Álvarez *et al.*, 2013) y *Baccharis macrantha* (Ávila-Martínez *et al.*, 2015), y en suelos cultivados con maíz (Zahid *et al.*, 2015; Kuan *et al.*, 2016) y tomate (Sánchez López *et al.*, 2012; Widnyana & Javandira, 2016). Además, estas bacterias han sido reconocidas como promotoras del crecimiento por aumentar la disponibilidad de nutrientes, producir fitohormonas importantes para el crecimiento de las plantas (Bhattacharyya y Jha, 2012; Agbodjato *et al.*, 2015; Zahid *et al.*, 2015; Kuan *et al.*, 2016), y actuar como agentes de biocontrol de varias enfermedades producidas por hongos (Dutta *et al.*, 2018; Haney *et al.*, 2018; Takishita *et al.*, 2018).

Identificación molecular de las rizobacterias

Pseudomonas fluorescens, *Pseudomonas fragi* y *Pseudomonas* sp., presentaron un nivel alto de similitud (~99%). Diversas cepas de *Pseudomonas* han sido reconocidas por su capacidad para producir sideróforos (Sah *et al.*, 2017), solubilizar fosfatos en el suelo (Pereira & Castro, 2014, Marrero *et al.*, 2015), además de producir y secretar sustancias con capacidad antibiótica como el Diacetilfloroglucinol (Babalola, 2010). Martin *et al.* (2003) y Selvakumar *et al.* (2009), señalan que *Pseudomonas fragi* tiene la capacidad de solubilizar P y producir ácido indol-acético.

Solubilización de fosfatos en condiciones *in vitro*

Se obtuvieron halos de solubilización con diámetros que variaron entre >1–3 mm, similares a los obtenidos por Ávila-Martínez *et al.* (2015), donde la mayoría de las bacterias aisladas presentaron halos inferiores a los 2 mm. Contrario a lo reportado por Pande *et al.* (2017), Paul & Sinha (2017) y Suleman *et al.* (2018), quienes observaron halos de más de >4 mm. Además, se pudo evidenciar el viraje del pigmento morado a naranja en el medio de cultivo, debido probablemente a la producción de ácidos orgánicos y polisacáridos, o a la actividad de las enzimas fosfatasa (Paul & Sinha, 2013).

Los índices de solubilización de fosfatos (IS) entre 1.47 a 2.49, concuerdan con otras investigaciones (Muleta *et al.*, 2013; Ávila-Martínez *et al.*, 2015; Matos *et*



al., 2017; Paul & Sinha, 2013), con IS entre 1 a 4.8, mientras que Pande *et al.* (2017) y Suleman *et al.* (2018), reportan IS mayores a >5. Las bacterias que produjeron los IS más altos en este estudio fueron *Pseudomonas fluorescens* (Wein6) y *Pseudomonas sp.*, (Char1), las cuales han sido reconocidas como bacterias solubilizadoras de fosfatos (Pande *et al.*, 2017), debido a la capacidad que tienen para producir ácidos orgánicos (Muleta *et al.*, 2013), ayudar al crecimiento de las plantas y sintetizar fitohormonas (Wani *et al.*, 2007).

Producción de ácido 3-indol acético en condiciones *in vitro*

Solo el 93.3 % de las rizobacterias produjeron concentraciones diferentes de ácido 3-indol acético (AIA) en condiciones *in vitro*, en donde *Pseudomonas sp.*, (Char1) con 83.9 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, *P. fluorescens* (Wein6) con 60.8 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ y el control positivo *P. fluorescens* con 60.6 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, fueron las que produjeron más del 60 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de AIA. Estos resultados fueron altos si se comparan con los reportados por López *et al.* (2014) y Jeyanthi & Ganesh (2013), quienes obtuvieron una producción de 7.08 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ y 48 mg/mL^{-1} AIA respectivamente, en cepas de *Pseudomonas*, mientras que Angulo *et al.* (2014) y Rojas *et al.* (2016), en cepas del género *Bacillus* obtuvieron entre 4,60 a 17,04 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ y 2,92 a 17,01 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de AIA respectivamente.

Estos resultados demuestran que el género *Pseudomonas* tiene la capacidad para promover el crecimiento de las plantas, tal como se comprobó en plantas de arroz (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2016), maíz (Zahid *et al.*, 2015; Kuan *et al.*, 2016), soya (Husen *et al.*, 2011), tomate (Rojas-Solís *et al.*, 2016) y papa (Arseneault *et al.*, 2015).

Efecto de la inoculación en *Bucquetia glutinosa* y *Pentacalia pulchella*

La cepa *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525) correspondiente al control positivo, fue la que generó los mayores porcentajes de germinación en estas plantas. Sin embargo, las cepas *Pseudomonas fluorescens* (T2) y *Pseudomonas fragi* (T1) inoculadas en *Bucquetia glutinosa*, y la cepa *Pseudomonas fragi* (T1) en *Pentacalia pulchella*, también presentaron valores altos de germinación con respecto al control positivo. Estos resultados concuerdan con los reportados en



semillas *Baccharis macrantha* (Ávila-Martínez *et al.*, 2015), tomate (Conde *et al.*, 2018) y pimiento morrón (Hernández-Montiel *et al.*, 2018), donde se generaron efectos favorables en la germinación de estas semillas cuando fueron inoculadas con *Pseudomonas fluorescens*.

Aunque la cepa de *Pseudomonas fragi* no presentó la misma capacidad de *P. fluorescens* para solubilizar fosfatos y producir AIA, si lo hizo cuando esta fue inoculada en las semillas de *P. pulchella*, dando como resultado, porcentajes de germinación altos con respecto al control positivo. Esta bacteria ha sido reconocida en otros estudios por solubilizar P y promover el crecimiento en plantas de trigo (Selvakumar *et al.*, 2009) y por producir ácido indolacético (IAA) en plantas de fresa (Martin *et al.*, 2003)

Los valores máximos de altura en *Bucquetia glutinosa* y *Pentacalia pulchella*, fueron influenciados por el control positivo (T5) *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525), seguido por *Pseudomonas fluorescens* (T2), mientras que *Pseudomonas fluorescens* (T2) en *Bucquetia glutinosa* y *Pseudomonas sp.*, *Pentacalia pulchella* fueron las cepas que generaron un mayor efecto sobre la longitud de la raíz y el peso total de estas plantas. Estas bacterias han sido reconocidas en muchas investigaciones, por su capacidad para estimular y promover el crecimiento vegetal, por medio de la solubilización de fosfatos, la producción de sideróforos y sustancias promotoras de crecimiento como las auxinas (AIA) (Saha *et al.*, 2013; Glick, 2014; Grobelak *et al.*, 2015; Ali-Saber *et al.*, 2015), giberelinas, etileno, cito-quininas y el ácido abscísico (Tahir & Aqeel, 2013; Molina-Romero *et al.*, 2015).

Los resultados obtenidos en este estudio, corroboran que la cepa de *Pseudomonas fluorescens* aislada en los suelos del páramo de Rabanal, tiene la capacidad para solubilizar fosfatos y producir AIA, por lo cual se considera como una bacteria promotora de crecimiento vegetal, debido a que estimuló la germinación y el crecimiento de las plantas de *Bucquetia glutinosa* y *Pentacalia pulchella* en condiciones de invernadero. Además, estos resultados permiten evidenciar que esta bacteria puede ser usada como un estimulador del



crecimiento en diferentes especies de interés en procesos de restauración ecológica en condiciones de campo.

CONCLUSIONES

- Las condiciones de acidez y la deficiencia de nutrientes que presentan los suelos del páramo de Rabanal pueden actuar como un factor limitante para el crecimiento y desarrollo de las plantas.
- Las bacterias *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi* y *Pseudomonas* sp., identificadas por medio de la amplificación de la región 16s del rRNA, presentaron la mayor capacidad para solubilizar fosfatos y producir AIA en condiciones *in vitro*.
- *Pseudomonas fluorescens* aislada en los suelos del páramo de Rabanal, se considera como una bacteria promotora de crecimiento vegetal, al evidenciarse en invernadero un efecto positivo sobre el crecimiento y desarrollo en *Bucquetia glutinosa* y *Pentacalia pulchella*.
- Aunque el género *Bacillus* sp., es considerado como un promotor del crecimiento vegetal, en este estudio no se pudo comprobar esto, ya que esta bacteria no generó grandes halos de solubilización ni produjo cantidades significativas de AIA en condiciones *in vitro*.
- Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que la inoculación con bacterias promotoras de crecimiento, puede ser una estrategia efectiva para estimular el crecimiento y desarrollo de diferentes especies vegetales usadas en procesos de restauración ecológica.

RECOMENDACIONES

- Es necesario seguir adelantando este tipo de investigaciones en condiciones de campo, con el fin de conocer el efecto de estas bacterias sobre las demás plantas de interés que habitan los páramos.



- Para próximas investigaciones, es conveniente identificar los ácidos orgánicos que son producidos por las bacterias y que intervienen en la promoción del crecimiento vegetal.

BIBLIOGRAFÍA

- Acero-Nitola, A. & Cortés-Pérez, F. (2015). Propagation of native species from the basin of La Vega River, Tunja, Boyacá, with potential for ecological restoration. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Exact. Fis. Nat*, 38(147):195-205.
- Agbodjato, N., Noumavo, P., Baba-Moussa, F., Salami, H., Sina, H., *et al.* (2015). Characterization of potential plant growth promoting rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in central and northern Benin (West Africa). *Appl. Environ. Soil Sci*, 1–9.
- Aguirre-Medina, J., Mina-Briones, F., Cadena-Iñiguez, J., Dardón-Zunun, J. & Hernández-Sedas, D. (2014). Crecimiento de *Cedrela odorata* L. Biofertilizada con *Rhizophagus intraradices* y *Azospirillum brasilense* en vivero. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 20(3):177-186.
- Ahemad, M. & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *J. King Saud Univ.– Sci*, 26:1-20.
- Ali-Saber, F., Abdelhafez, A., Hassan, E. & Ramadan, E. (2015). Characterization of fluorescent pseudomonads isolates and their efficiency on the growth promotion of tomato plant. *Annals of Agricultural Sciences*, 60(1):131-140.
- Álvarez, C., Osorio, N. & Marín, M. (2013). Identificación molecular de microorganismos asociados a la rizosfera de plantas de vainilla en Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 18(2):293-305.
- Angulo, V., Sanfuentes, E., Rodríguez, F. & Sossa, K. (2014) Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Rev. Argent Microbiol*, 46(4):338-347.
- Araya, E., Gómez, L., Hidalgo, N. & Valverde, R. (2000). Efecto de la luz y del ácido giberélico sobre la germinación *in vitro* de jaúl (*Alnus acuminata*). *Agron. Costarr*, 24(1):75-80.
- Arseneault, T., Goyer, C. & Fillion, M. (2015). *Pseudomonas fluorescens* LBUM223 increases potato yield and reduces common scab symptoms in the field. *Phytopathol*, 105(10):1311-1317.



- Ávila-Martínez, E., Lizarazo-Forero, L. & Cortés-Pérez, F. (2015). Promoción del crecimiento de *Baccharis macrantha* (Asteraceae) con bacterias solubilizadoras de fosfatos asociadas a su rizosfera. *Acta biol. Colomb*, 20(3):121-131.
- Babalola, O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology letters*, 32(11):1559-1570.
- Barquero, L., Roos, M., Lorío, L. & Chinchilla, R. (2015). Inoculación al suelo con *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum oryzae*, *Bacillus subtilis* y microorganismos de montaña (mm) y su efecto sobre un sistema de rotación soya-tomate bajo condiciones de invernadero. *Agronomía Costarricense*, 39(3).
- Barrera, J., Contreras, S., Garzón, N., Moreno, A. & Montoya, S. (2010). Manual para la restauración ecológica de los ecosistemas disturbados del distrito capital. Primera Edición. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Bashan, Y., Salazar, G., Moreno, M., Lopez, B. & Linderman, R. (2012). Restoration of eroded soil in the Sonoran desert with native leguminous trees using plant growth-promoting microorganisms and limited amounts of compost and water. *Journal of Environmental Management*, 102:26–36.
- Bautista, G., Mendoza, H. & Uribe, D. (2007). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* in native potato (*Solanum phureja*) plants using native *Pseudomonas fluorescens*. *Acta Biológica Colombiana*, 12(1):19-32.
- Beltrán-Pineda, M. (2014). Estudio comparativo de poblaciones microbianas totales y solubilizadoras de fosfato en suelos de páramo cultivados con papa (*Solanum tuberosum*) en Ventaquemada-Boyacá. *Investigación, innovación, ingeniería*, 2:56-74.
- Berger, B., Wiesner, M., Brock, A., Schreiner, M. & Ruppel, S. (2015). *K. radicincitans*: a beneficial bacteria that promotes radish growth under field conditions. *Agron. Sustain. Dev*, 35:521-1528.
- Bernal, L. (2010). Aislamiento de microorganismos solubilizadores de P (PSM) de las raíces de *Vanilla* sp. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 30 p.
- Bhattacharyya, P. & Jha, D. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbial. Biotechnol*, 28:1327–1350.
- Bullock, J., Aronson, J., Newton, A., Pywell, R. & Rey-Benayas, J. (2011). Restoration of ecosystem services and biodiversity: conflicts and opportunities. *Trends in Ecology and Evolution*, 26:541–549.



- Cardenas-Burgos, C. (2018). Sistema reproductivo, análisis citogenético y micropropagación de *Bucquetia glutinosa* y *Monochaetum myrtoideum* con fines de restauración, replantación y conservación del páramo de rabanal, Boyacá-Colombia. Tesis de Maestría. Universidad Pedagógica Y Tecnológica De Colombia.
- Castellanos, D., Burgos, L., Zabala, D., Botía, M. & Fernanda, M. (2010). Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, Cesar (Colombia). *Acta Biológica Colombiana*, 15(3):107-120.
- Chau, J., Bagtzoglou, A. & Willig, M. (2011). The effect of soil texture on richness and diversity of bacterial communities. *Environ. Forensics* 12:333–341.
- Cline, M. (1944). Principles of soil sampling. *Soil Science*. 58:275.
- Conde, M., Ocampo, S., Castañeda, G., Hernández, A. & Aguilar, G. (2018). Effect of fluorescent *Pseudomonas* on tomato seed germination and seedling vigor. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 24(2):121-131.
- Corporación autónoma regional de Chivor (CORPOCHIVOR). (2014). Actualización y socialización del plan de manejo ambiental para el distrito regional de manejo integrado (DRMI) páramo de Rabanal. 86 p.
- Daza-Torres, M., Hernández-Flórez, F. & Alba-Triana, F. (2014). Efecto del uso del suelo en la capacidad de almacenamiento hídrico en el páramo de Sumapaz-Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 67(1):7189-7200.
- De-Bashan, L., Hernández, J. & Bashan, Y. (2012). The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation-a comprehensive evaluation. *Applied Soil Ecology*, 61:171–189.
- Delgado, A. & Gómez, J. (2016). Soil. Physical, Chemical and Biological Properties. Chapter 2. En: Villalobos, E. Fereres (eds.), *Principles of Agronomy for Sustainable Agriculture*, Springer International. España. 549 p.
- Díaz, E., León, O. & Vargas, O. (2008). Sobrevivencia y crecimiento de plántulas debajo de *Lupinus bogotensis* implicaciones para la restauración. En: Vargas, O. 2008. Estrategias para la restauración ecológica del bosque Alto andino: El caso de la Reserva Forestal Municipal de Cogua, Cundinamarca. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, 372 p.
- Dutta, S., Surovy, M., Gupta, D., Mahmud, N., Chanclud, E., *et al.* (2018). Genomic analyses reveal that biocontrol of wheat blast by *Bacillus* spp.



may be linked with production of antimicrobial compounds and induced systemic resistance in host plants. *Figshare*, 1–7.

- Farina, R., Beneduzi, A., Ambrosini, A., Campos, S., Brito, B., *et al.* (2012). Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. *Appl Soil Ecol*, 55:44-52.
- Fasciglione, G., Casanovas, E., Quillehauquy, V., Yommi, A., Goni, M., *et al.* (2015). *Azospirillum* inoculation effects on growth, product quality and storage life of lettuce plants grown under salt stress. *Scientia Horticult*, 195:154–162.
- Figueiredo, N., Carranca, C., Goufo, P., Pereira, J., Trindade, H. & Coutinho, J. (2015). Impact of agricultural practices, elevated temperature and atmospheric carbon dioxide concentration on nitrogen and pH dynamics in soil and floodwater during the seasonal rice growth in Portugal. *Soil Tillage Res*, 145:198-207.
- Finkel, O., Castrillo, G., Paredes, S., González, I. & Dagl, J. (2017). Understanding and exploiting plant beneficial microbes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 38: 55–163.
- Fischer, S., Fischer, S., Magris, S. & Mori, G. (2007). Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere of wheat. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(7):895-903.
- Flórez-Márquez, J., Leal-Medina, G., Ardila-Leal, L. & Cárdenas-Caro, D. (2017). Aislamiento y caracterización de rizobacterias asociadas a cultivos de arroz (*Oryza sativa* L.) del Norte de Santander (Colombia). *Agrociencia*, 51(4):373-391.
- Garrido, M. (2007). Aislamiento e identificación de bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas asociadas a suelos y pastos del valle y sabana del cesar en dos épocas climáticas. Tesis Maestría en Biología Aplicada. Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá.
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169(1),30-39.
- Glickman, E. & Dessaux, Y. (1995). A Critical examination of the specificity of the salkowsky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2):793-796.
- Grobelak, A., Napora, A., & Kacprzak, M. (2015). Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. *Ecological Engineering*, 84:22-28.



- Haney, C., Wiesmann, C., Shapiro, L., Melnyk, R., O'Sullivan, L., *et al.* (2018). Rhizosphere-associated *Pseudomonas* induce systemic resistance to herbivores at the cost of susceptibility to bacterial pathogens. *Mol. Ecol*, 27:1833–1847.
- Hernández-Montiel, L., Contreras, C., Gregorio, R., Castillo-Rocha, D., Chiquito-Contreras, C., *et al.* (2018). Efecto de microcápsulas de *Pseudomonas putida* sobre crecimiento y rendimiento de pimiento morrón. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 9(20):4223-4233.
- Hernández-Pineda, L., Roa-Casas, O. & Cortés-Pérez, F. (2015). Crecimiento de *Baccharis macrantha* y *Viburnum triphyllum*, dos especies nativas útiles en restauración ecológica, plantadas en un pastizal andino (Boyacá, Colombia). *Biota Colombiana*, 15(2):27-38.
- Hernández-Rodríguez, A., Rives-Rodríguez, N., Díaz-de la Osa, A., de la Fe-Pérez, Y., Pijeira-Fernández, G. & Divan-Baldani, V. (2016). Caracterización de bacterias diazotróficas asociativas con actividad promotora del crecimiento vegetal en *Oryza sativa* L. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 5(2):9.
- Hernández-Velandia, D. & Lizarazo-Forero, L. (2015). Bacterias heterótrofas y oligotróficas en zonas conservadas e intervenidas del páramo de La Cortadera, Boyacá, Colombia. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 18(2):475-483.
- Hofstede, R., Segarra, P. & Vasconez, P. (2003). Los páramos del mundo. Global Peatland Initiative/ NC-IUCN/ Ecociencia. Quito. 299 p.
- Husen, E., Wahyudi, A. & Suwanto, A. (2011). Soybean response to 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate deaminase-producing *Pseudomonas* under field soil conditions. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 6(2):273-278.
- Instituto Geografico Agustin Codazzi (IGAC).1990. Métodos Analíticos Laboratorio de Suelos. Subdirección de agrología. Bogotá D. C. 499 p.
- Jassey, V., Chiapusio, G., Binet, P., Buttler, A., Laggoun-Défarge, F. *et al.* (2013). Above- and belowground linkages in *Sphagnum* peatland: climate warming affects plant-microbial interactions. *Global Chang. Biol*, 19:811–823.
- Jeyanthi, V. & Ganesh, P. (2013). Production, optimization and characterization of phytohormone Indole Acetic Acid by *Pseudomonas fluorescence*. *Int J. Pharma Biol Arch*, 4(2):514–20.
- Kasotia, A., Varma, A., Tuteja, N. & Choudhary, D. (2016). Microbial-mediated amelioration of plants under abiotic stress: an emphasis on arid and



- semiarid climate. In: Choudhary, D., Varma, A., Tuteja, N. (Eds.), *Plant-microbe Interaction: an Approach to Sustainable Agriculture*. Springer, Singapore, pp. 155–163.
- Kuan, K., Othman, R., Abdul, R. & Shamsuddin, Z. (2016). Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. *PLoS One*, 11(3):e0152478.
- Kumar, V. & Narula, N. (1999). Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biology and Fertility of Soils*, 28(3):301- 305.
- Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R., & Fierer, N. (2009). Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(15), 5111-5120.
- Liu, F., Xing, S., Ma, H., Du, Z. & Ma, B. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria affect the growth and nutrient uptake of *Fraxinus americana* container seedlings. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97:4617–4625.
- Lizarazo-Medina, P. & Gómez-Vásquez, D. (2015). Microbiota rizosférica de *Espeletia* sp. de los Páramos de Santa Inés y de Frontino-Urao en Antioquia, Colombia. *Acta Biol. Colomb*, 20(1):175-182.
- López, D., Hoyos, A., Perdomo, F. & Buitrago, R. (2014). Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal solubilizadoras de fosfato en *Lactuca sativa* cultivar White Boston. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(2):122-128.
- Marrero, M., Agaras, B., Wall, L. & Valverde, C. (2015). Enriquecimiento diferencial de *Pseudomonas* spp. en el rizoplaneo de distintas especies cultivadas. *Revista argentina de microbiología*, 47(2):132-137.
- Martin, L., Velázquez, E., Rivas, R., Mateos, P., MartínezMolina, E., *et al.* (2003). Effect of inoculation with a strain of *Pseudomonas fragi* on the growth and phosphorus content of strawberry plants. In Velazquez, E. & Rodriguez-Barrueco, C (eds.). (2002). *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, Springer, The Netherlands, pp. 309-315.
- Matos, A., Gomes, I., Nietsche, S., Xavier, A., Gomes, W., *et al.* (2017). Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89(4):2945-2954.
- Mayer, A. (1958). Determination of indole acetic acid by the Salkowsky reaction. *Nature*, 162:1670-1671.



- Miller, C., Handley, K., Wrighton, K., Frischkorn, K., Thomas, B. & Banfield, J. (2013). Short-read assembly of full-length 16S amplicons reveals bacterial diversity in subsurface sediments. *PloS one*, 8(2):e56018.
- Mohan, V. & Radhakrishnan, A. (2012). Screening of phosphate solubilizing bacterial isolates for the growth improvement of *Tectonia grandis* Linn. *Res J Microbiol*, 7(2):101-113.
- Molina-Romero, D., Bustillos-Cristales, M., Rodríguez-Andrade, O. & Elizabeth, Y. (2015). Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Revista de La DES Ciencias Biológico Agropecuarias*, 17(2):24-34.
- Montenegro, A. & Vargas, O. (2008). Atributos vitales de especies leñosas en bordes de bosque altoandino de la Reserva Forestal de Cogua (Colombia). *Revista de Biología Tropical*, 56(2):705-720.
- Morales, M., Otero, J., Van der Hammen, T., Torres, A., Cadena, C., et al. (2007). Atlas de páramos de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D. C. 208 p.
- Muleta, D., Assefa, F., Börjesson, E. & Granhall, U. (2013). Phosphate-solubilising bacteria associated with *Coffea arabica* L. in natural coffee forests of southwestern Ethiopia. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 12(1):73-84.
- Müller, A. & Weiler, E. (2000). Indolic constituents and indole-3-acetic acid biosynthesis in the wild-type and a tryptophan auxotroph mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 211:855–863.
- Muñoz, F. & Pérez, E. (2018). Conflictos de uso de suelo en la frontera agrícola y áreas del páramo del municipio de Totoró, Cauca. *Suelos Ecuatoriales*, 47(1 y 2):10-17.
- Murcia-Linares, A. & Cruz-Bustos, S. (2017). Efecto de la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en maracuyá y badea cultivadas en condiciones de estrés hídrico. (Tesis de pregrado). Bogotá: Universidad de la Salle.
- Murillo-Amador, B., Troyo-Diéguez, E., Jones, H., AyalaChairez, F., Tinoco-Ojanguren, C. & López-Cortés, A. (2000). Screening and classification of cowpea genotypes for salt tolerance during germination. *J. Exp. Bot.*, 67:71-84.
- Ortiz-Galeana, M., Hernández-Salmerón, J., Valenzuela-Aragón, B., De los Santos-Villalobos, S., Rocha-Granados, M. & Santoyo G. (2018). Diversidad de bacterias endófitas cultivables asociadas a plantas de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. Biloxi con actividades



- promotoras del crecimiento vegetal. *Chilean J. Agric. Anim. Sci., ex Agro-Ciencia*, 34(2):140-151.
- Pande, A., Pandey, P., Mehra, S., Singh, M., & Kaushik, S. (2017). Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2),379-391.
- Patten, C. & Glick, B. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(8):3795-3801.
- Paul, D. & Sinha, S. (2013). Isolation of phosphate solubilizing bacteria and total heterotrophic bacteria from river water and study of phosphatase activity of phosphate solubilizing bacteria. *Adv. Appl. Sci. Res.*, 4:409-412.
- Paul, D. & Sinha, S. (2017). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India. *Annals of Agrarian Science*, 15(1):130-136.
- Pereira, S. & Castro, P. (2014). Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance *Zea mays* growth in agricultural P-deficient soils. *Ecological Engineering*, 73:526-535.
- Radhapriya, P., Ramachandran, A., Dhanya, P., Remya, K. & Malini, P. (2014). An appraisal of physico-chemical and microbiological characteristics of Nanmangalam Reserve Forest soil. *Journal of Environmental Biology*, 35(6):1137–1144.
- Radhapriya, P., Ramachandran, A. & Palani, P. (2018). Indigenous plant growth-promoting bacteria enhance plant growth, biomass, and nutrient uptake in degraded forest plants. *3 Biotech*, 8(3):1-10.
- Ramachandran, A. & Radhapriya, P. (2016). Restoration of degraded soil in the Nanmangalam Reserve Forest with native tree species: effect of indigenous plant growth-promoting bacteria. *The Scientific World Journal*, 2016:1-9.
- Rey-Benayas, J. & Bullock, J. (2012). Restoration of biodiversity and ecosystem services on agricultural land. *Ecosystems*, 15(6):883-899.
- Rivera, D. & Rodríguez, C. (2011). Guía divulgativa de criterios para la delimitación de páramos de Colombia. Bogotá. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. 68 p.
- Rojas-Solís, D., Hernández-Pacheco, C. & Santoyo, G. (2016). Evaluación de *Bacillus* y *Pseudomonas* para colonizar la rizosfera y su efecto en la



- promoción del crecimiento en tomate (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.). *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 22(1):45-58.
- Rojas, M., Tejera, B., Bosh, D., Ríos, Y., Sánchez, J. & Heydrich, M. (2016) Potencialidades de cepas de *Bacillus* para la promoción del crecimiento en el cultivo del *Zea mays* L. *Cub J. Agric. Sci.*, 50(3):485-496.
- Román, N., Mamani, G. & García, D. (2013). Caracterización molecular de bacteria *Azospirillum* sp, *Azotobacter* sp y *Pseudomonas* sp. promotoras del crecimiento vegetal de cultivos de *Solanum tuberosum* y *Zea mays*. *PROSPECTIVA UNIVERSITARIA*, 10(1):3-16.
- Sah, S., Singh, N., & Singh, R. (2017). Iron acquisition in maize (*Zea mays* L.) using *Pseudomonas* siderophore. *3 Biotech*, 7(2):121.
- Saha, R., Saha, N., Donofrio, R. & Bestervelt, L. (2013). Microbial siderophores: a mini review. *Journal of basic microbiology*, 53(4):303-317.
- Sánchez, D., Gómez, R., Garrido, M. & Bonilla, R. (2012). Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(7):1401-1415.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M. & Glick, B. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological research*, 183:92-99.
- Sarmiento, C., Cadena, C., Sarmiento, M., Zapata, J. & León, O. (2013). Aportes a la conservación estratégica de los páramos de Colombia: Actualización de la cartografía de los complejos de páramo a escala 1:100.000. Bogotá, D.C.: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Selvakumar, G., Joshi, P., Nazim, S., Mishra, P., Bisht, J. & Gupta, H. (2009). Phosphate solubilization and growth promotion by *Pseudomonas fragi* CS11RH1 (MTCC 8984), a psychrotolerant bacterium isolated from a high altitude Himalayan rhizosphere. *Biología*, 64(2):239-245.
- Siciliano, S. D., Palmer, A. S., Winsley, T., Lamb, E., Bissett, A., Brown, M. V., ... & Chu, H. (2014). Soil fertility is associated with fungal and bacterial richness, whereas pH is associated with community composition in polar soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 78, 10-20.
- Singh, S., Tripathi, D., Singh, S., Sharma, S., Dubey, N., et al. (2017). Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: a review. *Environ. Exp. Bot.*, 137:177-193.
- Sivasakthi, S., Usharani, G. & Saranraj, P. (2014). Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)-*Pseudomonas fluorescens* and



Bacillus subtilis: a review. *African journal of agricultural research*, 9(16):1265-1277.

- Suleman, M., Yasmin, S., Rasul, M., Yahya, M., Atta, B., & Mirza, M. (2018). Phosphate solubilizing bacteria with glucose dehydrogenase gene for phosphorus uptake and beneficial effects on wheat. *PloS one*, 13(9): e0204408.
- Tahir, M. & Aqeel, S. (2013). Plant Growth promoting rhizobacteria (PGPR): A budding complement of synthetic fertilizers for improving crop production. *Pakistan Journal of Life and Social Sciences*, 11(1):1-7.
- Takishita, Y., Charron, J. & Smith, D. (2018). Biocontrol rhizobacterium *Pseudomonas* sp. 23S induces systemic resistance in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) against bacterial canker *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Front. Microbiol*, 9:2119.
- Tipayno, S., Kim, C. & Sa, T. (2012). T-RFLP analysis of structural changes in soil bacterial communities in response to metal and metalloid contamination and initial phytoremediation. *Appl. Soil Ecol.*, 61:137–146.
- Useche, D. & Márquez, S. (2015). Diagnóstico socio-ambiental de la producción agrícola en el páramo de Rabanal (Colombia) como base para su reconversión agroecológica. *Ciencia y Agricultura*, 12(1):27-37.
- Vargas, O. (2011). Restauración ecológica: biodiversidad y conservación. *Acta Biológica Colombiana*, 16(2):221-246.
- Vargas, O. 2013. Disturbios en los páramos andinos. En: Cortés-Duque, J. & Sarmiento, C. (Eds). 2013. Visión socioecosistémica de los páramos y la alta montaña colombiana: memorias del proceso de definición de criterios para la delimitación de páramos. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D.C. Colombia.
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., Boyce, A. (2016). Role of plant growth promoting Rhizobacteria in agricultural sustainability- A review. *Molecules*, 21(573):1–17.
- Velasco-Linares, P., Díaz-Martín, R. & Vargas, O. (2008). Los parches de plantas herbáceas colonizadoras de potreros y el crecimiento y supervivencia de especies heliófilas leñosas. En: Vargas, O. 2008. Estrategias para la restauración ecológica del bosque Altoandino: El caso de la Reserva Forestal Municipal de Cogua, Cundinamarca. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, 372p.
- Viteri, P., Castillo, D. & Viteri, R. (2016). Capacidad y diversidad de bacterias celulolíticas aisladas de tres hábitats tropicales en Boyacá, Colombia. *Acta Agronómica*, 65(4),362-367.



- Wani, P., Khan, M. & Zaidi, A. 2007. Chromium reduction, plant growth promoting potentials and metal solubilization by *Bacillus* sp. isolated from alluvial soil. *Current Microbiology* , 54:237–243.
- Wardle, D., Jonsson, M., Bansal, S., Bardgett, R., Gundale, M. & Metcalfe, D. (2012). Linking vegetation change, carbon sequestration and biodiversity: insights from island ecosystems in a long-term natural experiment. *J. Ecol.*, 100:16-30.
- Widnyana, I. & Javandira, C. (2016). Activities *Pseudomonas* spp. and *Bacillus* sp. to stimulate germination and seedling growth of tomato plants. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 9:419-423.
- Yu, X., Liu, X., Zhu, T., Liu, G., Mao, C. (2012). Co-inoculation with phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their effect on growth promotion and nutrient uptake by walnut. *Eur J Soil Biol.*, 50:112-117.
- Zahid, M., Abbasi, M. K., Hameed, S. & Rahim, N. (2015). Isolation and identification of indigenous plant growth promoting rhizobacteria from Himalayan region of Kashmir and their effect on improving growth and nutrient contents of maize (*Zea mays* L.). *Front Microbiol*, 6, 207.