Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad Nacional de La Pampa

Tesina presentada para obtener el grado académico de

LICENCIADO EN QUÍMICA

Caracterización de cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* y su evaluación en la coinoculación de vicia con bacterias PGPR

Tesista: María Florencia Varela

Directora: Dra. Ana Lía Ronchi

Santa Rosa (La Pampa)
ARGENTINA

2007

"Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Licenciado en Química, de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Departamento de Química, durante el período comprendido entre Marzo de 2006 y Agosto de 2007, bajo la dirección de la Dra. Ana Lía Ronchi."

María Florencia Varela

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

INDICE

1. Introducción 3
- 1.1 Importancia del N. Ciclo del elemento 3
- 1.2 Fijación Simbiótica de Nitrógeno (FSN) 4
- 1.3 Ecología de la asociación rizobio – leguminosa 8
- 1.4 Importancia de la Fijación Simbiótica de Nitrógeno en vicia. 11
- 1.5 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) 13
  - 1.5.1 Bacterias Solubilizadoras de Fosfatos 14

2. Objetivos 15

3. Materiales y métodos 16
- 3.1 Cepa de *R. leguminosarum* de uso comercial 16
- 3.2 Aislamientos de nódulos de vicia 16
- 3.3 Caracterización de aislamientos de nódulos 17
  - 3.3.1 Observación microscópica 17
  - 3.3.2 Caracterización morfológica de las colonias desarrolladas en medio YEM 17
  - 3.3.3 Tinción de Gram 17
  - 3.3.4 Desarrollo en cultivo líquido y determinación de parámetros de crecimiento de los aislamientos 17
  - 3.3.5 Caracterización por electroforesis de isoenzimas, revelando para α y β esterasas 18
- 3.4 Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fósforo 20
- 3.5 Caracterización de bacterias solubilizadora de fósforo 20
  - 3.5.1 Observación microscópica 20
  - 3.5.2 Caracterización morfológica de las colonias desarrolladas en medio NBRIP 20
  - 3.5.3 Tinción de Gram 21
  - 3.5.4 Crecimiento en medio King A y King B 21
  - 3.5.5 Curva de crecimiento de la bacteria SP en medio NBRIP 21
  - 3.5.6 Curva de solubilización de fosfatos en medio líquido NBRIP 21
- 3.6 Características del suelo utilizado 22
  - 3.6.1 Análisis físico – químico 22
  - 3.6.2 Número más probable de rizobios (NMP) 22
- 3.7 Evaluación de la simbiosis rizobio - vicia en macetas. Efectividad simbiótica 23
  - 3.7.1 Parámetro de competitividad de las bacterias inoculadas frente a cepas nativas 24
  - 3.7.2 Parámetros de efectividad simbiótica 25

3.7.3 Condiciones experimentales 25
4. Resultados y discusión 26
4.1 Aislamientos de nódulos de vicia 26
4.2 Caracterización de aislamientos de nódulos y comparación con la cepa D70 26
4.3 Aislamiento de cepas solubilizadoras de fósforo 31
4.4 Caracterización de cepas solubilizadoras de fósforo 31
4.5 Características del suelo utilizado 33
4.5.1 Análisis físico químico 33
4.5.2 Número más probable de *R. leguminosarum* del suelo (NMP) 33
4.6 Evaluación de la simbiosis rizobio - vicia en macetas. Efectividad simbiótica 35
4.7 Ocupación nodular 37
5. Conclusiones 40
6. Bibliografía 41
Agradecimientos 45

1. INTRODUCCIÓN

Mejorar la fertilidad de los suelos es una de las estrategias más comunes para incrementar la producción agrícola. Mantener altos niveles de fósforo (P) y nitrógeno (N) disponibles, los dos nutrientes más limitantes de los suelos, permanece como el desafío más importante para ecologistas y productores agropecuarios (Nautiyal *et al.*, 2000), dentro del contexto de una agricultura sustentable.

1.1 Importancia del nitrógeno. Ciclo del elemento

El nitrógeno es un elemento esencial para las plantas, ya que forma parte de compuestos tan fundamentales como proteínas, ácidos nucleicos y clorofila (figura 1), necesitándose principalmente en los tejidos vegetales en crecimiento. Es el elemento que más comúnmente limita la producción de los cultivos de grano (Satorre *et al.*, 2003)

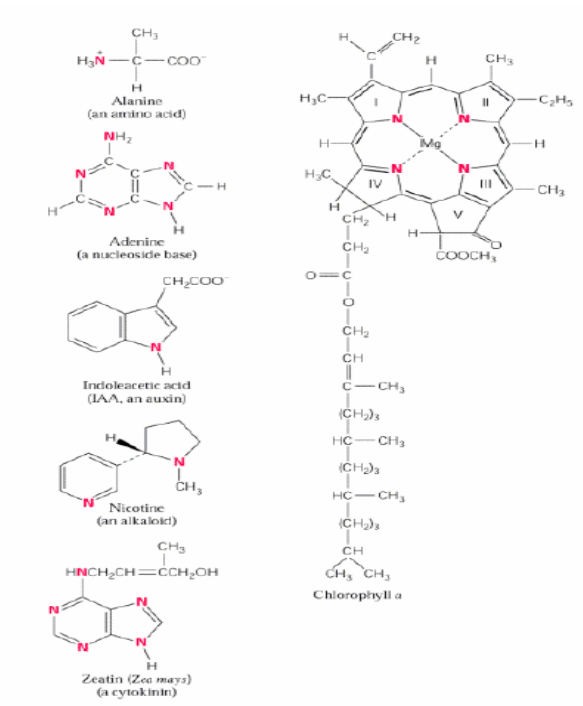


Figura 1. Algunos compuestos nitrogenados que constituyen los tejidos vegetales.

Dentro de los ciclos biogeoquímicos de los elementos minerales, el del N (figura 2) es especialmente complejo por encontrarse en la naturaleza en distintos estados de valencia (de +5 a -3) formando compuestos estables (Olivares, 2004). La fuente principal de N para el suelo es la atmósfera, donde es el

gas predominante (79,08 % en volumen). El nitrógeno atmosférico es un gas diatómico (N_2) muy inerte, debido a la alta energía del triple enlace de la molécula (Conti, 2000). La ciencia ha demostrado que la vía normal de ingreso de nitrógeno a las plantas proviene del suelo, y que para ser absorbido, se debe encontrar mineralizado, como nitrato (NO_3^-) o amonio (NH_4^+). Sin embargo, debido a que se acumula principalmente en formas orgánicas en el suelo, se hace necesaria su transformación microbiana, conocida como mineralización, para dejarlo disponible para las plantas (Urzúa, 2000). Puede observarse en la figura 2 que las vías de ingreso de N al sistema agrícola son: fijación biológica (simbiótica y no simbiótica), mineralización (amonificación) de residuos orgánicos animales y vegetales y aporte de fertilizantes orgánicos y/o inorgánicos (no se muestra en la figura). Las plantas absorben principalmente NO_3^-, que a su vez pueden perderse del sistema por lixiviación o desnitrificación bacteriana (pérdidas gaseosas) o bien inmovilizarse formando parte de tejidos microbianos; debido a su carga positiva, el NH_4^+ es susceptible de fijación sobre los coloides del suelo, quedando no disponible para las plantas.

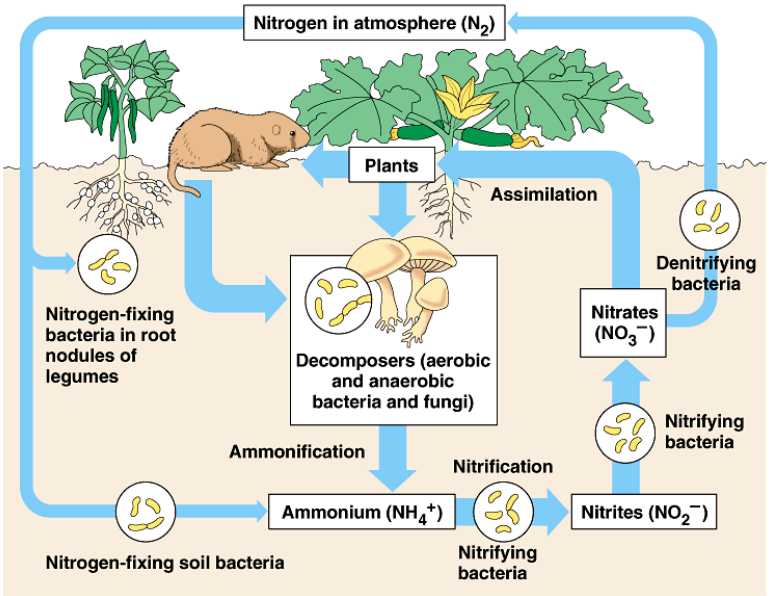


Figura 2. Ciclo del Nitrógeno.

La agricultura moderna utiliza plantas con potenciales productivos cada vez mayores, demandando una elevada nutrición nitrogenada, la cual puede ser muy superior al aporte de nitrógeno del suelo. Por lo tanto, en la mayoría de los cultivos es necesario suplementar con fertilizantes nitrogenados. Esto conlleva un considerable aumento en los costos de producción, así como también incrementos en la

contaminación del agua y del aire. En este aspecto cabe destacar la eutroficación de la desembocadura de cursos de agua que recogen excesos de nitratos provenientes de los campos aledaños, polución del agua potable que se obtiene de esos mismos cursos, desbalances nutricionales en los suelos, con pérdida de materia orgánica y polución atmosférica causada por las industrias productoras de fertilizantes. Resulta por ello indispensable manejar al N como recurso natural no sólo desde el punto de vista de su obtención sino también atendiendo al manejo de su circulación y su destino.

Afortunadamente, como se expresó anteriormente, existe otra vía de aporte de nitrógeno al sistema agrícola, llamada **fijación biológica de nitrógeno (FBN),** la cual es llevada a cabo por microorganismos procarióticos en vida libre o en simbiosis (en asociación mutualista con las plantas), denominándose en este último caso, **fijación simbiótica de nitrógeno (FSN)**. A través de esta vía es posible obtener un importante suministro de nitrógeno para determinadas especies vegetales (esencialmente leguminosas), las que en simbiosis con estas bacterias fijadoras de nitrógeno, principalmente rizobios, obtienen este elemento a un costo generalmente reducido (Urzúa, 2000; Olivares, 2004).

1.2 Fijación Simbiótica de Nitrógeno

La capacidad de las leguminosas de "nutrir al suelo" se conoce desde la antigüedad: pueden encontrarse recomendaciones de su uso en rotación con gramíneas ya en las culturas griega y romana, y las civilizaciones precolombinas de América solían cultivar maíz y poroto en hileras alternadas como metodología de conservación y biofertilización (Lodeiro *et al*., 2003). Sin embargo, información científica y técnica respecto de la fijación del nitrógeno existe desde hace poco más de un siglo.

Las plantas capacitadas para realizar FSN son principalmente especies de leguminosas (Familia *Leguminosae)* que, como todos los vegetales, absorben nitrógeno mineral del suelo, pero además pueden obtener nitrógeno atmosférico (Twornlow, 2004). Para que esto ocurra deben existir en el suelo bacterias pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae* (conocidas comúnmente como rizobios), las cuales están agrupadas en seis géneros: *Allorhizobium, Azorhizobium, Bradyrhizobium, Mesorhizobium, Rhizobium y Sinorhizobium*. Todas las especies comprendidas en estos géneros comparten la característica distintiva de formar nódulos fijadores de nitrógeno en las leguminosas y de allí proviene su importancia agronómica y ecológica.

Los rizobios tienen dos formas de vida: en *vida libre* se los encuentra en el suelo o en las etapas iniciales de la colonización e infección de la raíz y como *bacteroides* se los encuentra en el interior de los nódulos. Ambas formas difieren sustancialmente en su morfología y metabolismo. Entre las diferencias más sobresalientes, los rizobios en vida libre son bacilos móviles, incapaces de fijar N_2 y pueden utilizar diversas fuentes de carbono (C), mientras que los bacteroides tienen formas irregulares, son inmóviles, fijan N_2 y sólo pueden utilizar ácidos dicarboxílicos como succinato o malato como fuentes de C. Para que se produzca la transición entre los rizobios en vida libre y los bacteroides es necesario que los rizobios y las raíces se reconozcan mutuamente como simbiontes (de lo contrario los sistemas de defensa de la planta se activarían para contrarrestar la infección bacteriana), que se produzca el proceso de penetración a través de los pelos radiculares, que se diferencie y desarrolle el nódulo radicular y que éste sea invadido exitosamente por los rizobios antes de su diferenciación en bacteroides. En líneas generales, cada leguminosa libera al medio determinadas sustancias (flavonoides) que inducen la expresión en el rizobio especifico de genes nod, implicados en la síntesis de factores de nodulación o factores nod, los cuales están constituidos por un esqueleto de 4 a 5 N-acetil glucosaminas, con bastantes sustituciones que determinan la especificidad (existe cierta selectividad en el par rizobio/leguminosa, lo que da lugar a *grupos de inoculación cruzada*, que establecen la compatibilidad entre grupos de especies de leguminosas y grupos de rizobios). Estos factores determinan modificaciones en los pelos radicales, la formación de un canal de infección (figura 3) y la división de las células del córtex, que conducen a la formación del nódulo en cuyo interior, perfectamente estructurado, se llevará a cabo la fijación.

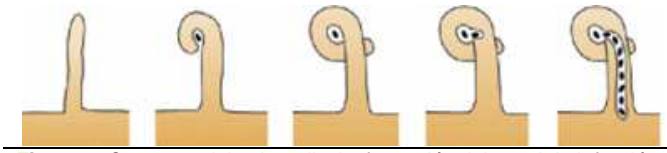


Figura 3. Curvatura del pelo radical y formación del canal de infección.

En los nódulos se transforma el nitrógeno atmosférico (N_2) a nitrógeno mineral (NH_4^+), por acción de la enzima nitrogenasa, permitiendo nutrir a la planta con el nitrógeno necesario para su síntesis proteica, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$N_2 + 16\ ATP + 8\ e^- + 10\ H^+ \xrightarrow{\text{nitrogenasa}} 2\ NH_4^+ + 8\ H_2 + 16\ ADP + 16\ P_i$$

La transformación del N_2 a NH_4^+ corresponde a un proceso de reducción química y para crear este ambiente reductivo, la planta genera una hemina (proteína) denominada leghemoglobina, que protege a la nitrogenasa del oxígeno, indispensable para la respiración celular pero que prácticamente debe estar ausente en este paso bioquímico. Cuando la leghemoglobina está activa produce una coloración rojiza característica que se puede apreciar al seccionar un nódulo ocupado por los bacteroides de *Rhizobium* en pleno proceso de fijación de N_2 atmosférico. Como contraparte, al nódulo llegan los fotosintatos, en forma de sacarosa, para soportar el proceso, los que servirán de fuente de energía, poder reductor y esqueleto carbonado para la incorporación del amonio resultante de la fijación, el que será transportado al resto de la planta en forma de amidas o ureídos, según el hospedador sea de origen templado o tropical. Cabe destacar que si bien esta reacción es de alto consumo energético (16 ATP), la leguminosa logra un balance positivo por la enorme cantidad de nitrógeno equivalente que produce (Urzúa, 2000; Olivares, 2004).

Las características genéticas que regulan todo el proceso radican en los genes responsables de la nodulación (conocidos como *nod, nol* y *noe*) y la fijación de nitrógeno (*nif* y *fix*) presentes en los rizobios. En la mayoría de las especies de crecimiento rápido, estos genes se encuentran en uno de los megaplásmidos (del orden de 10^5 pares de bases), denominado plásmido simbiótico (Watanabe, 2000; Olivares, 2004); en el caso de *Bradyrhizobium,* que no posee plásmidos, se encuentran en el cromosoma bacteriano.

Las ventajas de esta simbiosis son múltiples:

a) La planta puede autoabastecerse de nitrógeno, elevando considerablemente su contenido de proteínas.
b) Puede aportar nitrógeno a un cultivo acompañante de especies diferentes a las leguminosas (por ejemplo, praderas asociadas compuestas por gramíneas y leguminosas).
c) Puede dejar nitrógeno disponible en el suelo para el cultivo siguiente en la rotación, siempre que se incorporen los rastrojos y se mineralice el N. Una variante corresponde al uso de abonos verdes donde se establece un cultivo de leguminosas con el único objetivo de incorporarlo al suelo para promover la mineralización de su nitrógeno y suplir, así, las necesidades del cultivo siguiente en la rotación.

d) La eficiencia de la utilización del nitrógeno fijado por parte de la planta es cercana al 100%, en comparación con sólo el 50-60% de los fertilizantes nitrogenados aplicados al suelo. Es necesario puntualizar que las aplicaciones de fertilizantes nitrogenados se pierden parcialmente por lixiviación, desnitrificación e inmovilización microbiana, pudiendo convertirse en contaminantes de suelos, plantas, aguas, animales e, inclusive, seres humanos (Rodríguez, 1993; Urzúa, 2000).

A pesar de estas indiscutibles ventajas, los rizobios no siempre se encuentran en el suelo, están en poblaciones relativamente bajas o, si se encuentran presentes, muchas veces son de baja efectividad. Existe entonces la posibilidad de introducir artificialmente estos microorganismos en el suelo a través de la práctica de la inoculación y favorecer así la simbiosis. Adicionalmente, cabe destacar que inocular las semillas de leguminosas tiene un bajo costo para el productor, con un valor promedio estimado en sólo un 5% sobre costo de la semilla (Urzúa, 2000). La FSN resulta ser, entonces, una tecnología limpia de producción y una forma concreta de proteger el medio ambiente, que permite una excelente nutrición nitrogenada de pasturas y ahorros importantes en fertilizantes nitrogenados (Montañez *et al*., 2004).

1.3 Ecología de la asociación rizobio – leguminosa

Los rizobios son habitantes comunes de los suelos agrícolas. Pueden ser oriundos de dichos suelos, por ejemplo los rizobios noduladores de poroto en los suelos del noroeste argentino (Aguilar *et al.,* 1998), o introducidos en inoculantes para leguminosas, como es el caso de los suelos sudamericanos que contienen poblaciones de *B. japonicum* o *S. meliloti* oriundos del Viejo Mundo. Frecuentemente las poblaciones de rizobios de los suelos, ya sean oriundas o introducidas, compiten muy eficientemente con los inoculantes por la nodulación de los cultivos de leguminosas. Si dichas poblaciones contienen rizobios con aceptable capacidad de fijación de N_2, el problema no reviste mayor gravedad puesto que el cultivo obtendrá el N necesario del inoculante o de los rizobios del suelo por igual. En cambio, cuando el potencial de fijación de N_2 de las poblaciones del suelo es deficiente, como ocurre en la mayoría de los casos, el problema de la competición se vuelve grave. En efecto, siendo las poblaciones del suelo muy competitivas para la formación de nódulos, sólo una pequeña fracción de los mismos (usualmente menos del 15%) suele contener a los rizobios introducidos en el inoculante y como consecuencia, el N derivado

del aire en el cultivo resulta muy bajo (Sadowsky and Graham, 1998). En Maui, EEUU, Thies *et al.* (1991) observaron que la presencia tan sólo de 10 a 100 rizobios noduladores por gramo de suelo era suficiente para que la inoculación no tuviera efecto sobre el rendimiento en sus condiciones de cultivo. Dado que las leguminosas son ávidas consumidoras de N, una profusa nodulación con cepas de escasa efectividad simbiótica las vuelve "usurpadoras" del N del suelo. Si el contenido de N disponible en el suelo es ya de por sí bajo, los agricultores se ven exigidos a optar por el uso de fertilizantes para obtener un rendimiento económicamente rentable, lo cual no hace más que agravar el problema. Para los rizobios el nódulo es un ambiente protector y por eso se seleccionan naturalmente cepas muy competitivas para la infección y nodulación, mientras que el alto potencial de fijación de N_2 no es en sí mismo un carácter sujeto a selección natural y basta con que la población de rizobios asegure una pequeña provisión de N a las plantas. Por alguna razón, los rizobios del suelo son generalmente más competitivos que los del inoculante, y se especula con que alguna variable del ambiente edáfico, muy difícil de reproducir en el inoculante, es responsable por esta competitividad. Es necesario además considerar un efecto posicional: los rizobios inoculados sobre la semilla son incapaces de alcanzar las zonas infectables de la raíz en desarrollo, que se encuentran alejadas del punto de inoculación y que, sin embargo, están accesibles a los rizobios de la población nativa, distribuidos en forma pareja en el perfil de suelo explorado por las raíces. Este efecto posicional predomina aún cuando la competitividad intrínseca de las bacterias llevadas por el inoculante sea muy superior a la de las bacterias de la población, con lo cual este efecto se revela como un cuello de botella para conseguir una adecuada expresión del potencial del inoculante (López García *et al.,* 2003). La movilidad de los rizobios en el suelo es muy escasa (Madsen and Alexander, 1982; McDermott and Graham, 1989) y la colonización efectiva del perfil ocupado por las raíces parece depender de factores que promuevan el movimiento de las partículas de suelo, tales como la labranza, la acción de las lombrices, o bien que los rizobios sean transportados por el agua de percolación.

Competitividad: cada nódulo en general está ocupado por una sola cepa de rizobios, pero en una misma planta los diversos nódulos pueden contener, en conjunto, una variedad de cepas diferentes. Por otra parte, la cantidad total de nódulos por planta está regulada por ésta de modo tal de mantener un balance positivo entre la cantidad de recursos que necesita destinar como fotosintatos para mantener los nódulos en funcionamiento y el beneficio que obtiene en términos de N total fijado como aminoácidos o

ureídos. Dado que por un lado los nódulos constituyen ambientes favorables para los rizobios –ya sea por la protección directa que confieren o por favorecer la proliferación de rizobios en sus alrededores- y que por otro lado la cantidad de nódulos totales tiene un límite, es razonable que se establezca una competencia entre los distintos genotipos de rizobios presentes en el suelo para llegar a invadir e infectar esos pocos nódulos que una planta está dispuesta a ofrecer. Incluso, la propia planta puede llegar a jugar un papel más activo en esta competencia a través de una cierta selectividad cepa-variedad que se da en algunas leguminosas (Sadowski and Graham, 1998).

Medición y evaluación de la competitividad: para evaluar la capacidad competitiva de una cepa que va a ser utilizada como inoculante, debe poder identificársela en los nódulos de modo de poder establecer cuántos de ellos han sido formados por dicha cepa. Las maneras de lograr esta identificación son variadas: lo más común es utilizar cepas marcadas, ya sea con resistencias a antibióticos o con genes reportadores. En ambos casos, se extraen los nódulos de la planta, se los esteriliza superficialmente, se los aplasta en forma individual para liberar su contenido y se siembra en placas el extracto de cada nódulo para determinar la presencia o ausencia de la cepa marcada. En el caso de que no se cuente con cepas marcadas, puede realizarse la detección por técnicas de inmunología (por ej. ELISA), o por determinación de la huella digital de ADN, perfil isoenzimático o de lipopolisacáridos (LPS) de los rizobios extraídos de los nódulos. Estas metodologías tienen la ventaja de que no se introducen en el ambiente cepas recombinantes ni genes de resistencia a antibióticos pero su aplicación es más restringida: en el caso del ELISA sólo puede aplicarse cuando se sabe que la cepa inoculada y las cepas competidoras pertenecen a distintos serogrupos, o más laboriosas, en los últimos casos, debe hacerse una reacción por nódulo, lo cual puede ser impracticable cuando se evalúan miles de nódulos en un ensayo a campo. Tanto para los estudios con muestras de suelo en el laboratorio como para los estudios a campo, es muy importante conocer la cantidad de rizobios compatibles existente en la población del suelo, para lo cual deben aislarse de todo el resto de la microflora fúngica y bacteriana que los acompaña. Sin embargo, se conocen pocos ejemplos de medios selectivos para el crecimiento de los rizobios y comúnmente se recurre a atraparlos en los nódulos de una leguminosa. Para ello, las muestras de suelo se llevan al laboratorio y se siembra en ellas alguna leguminosa susceptible de ser nodulada por los rizobios que se desea aislar. Luego de un tiempo, se recogen los nódulos y se obtiene de su interior

los rizobios que había en la población del suelo. Una variante de esta metodología muy extensamente utilizada para cuantificar a la población de rizobios del suelo consiste en la determinación del *número más probable (NMP)* de rizobios noduladores de esa leguminosa. En vez de sembrar la leguminosa en las muestras de suelo, se extrae de éste a los rizobios por lavados en un buffer adecuado. Luego se practican diluciones seriadas del extracto y con cada una de las diluciones se inocula una serie de plantas de la leguminosa que va a servir para "atrapar" a los rizobios. Se permite la nodulación y se cuentan las plantas noduladas con cada dilución. Finalmente, con este dato se ingresa en tablas que dan el número más probable de rizobios noduladores contenidos en la muestra (Vincent, 1970).

1.4 Importancia de la FSN en vicia.

En el marco de la agricultura sustentable, se analizó el caso de la FSN para vicia (figura 4), una especie de leguminosa forrajera de uso alternativo en la región pampeana.

Figura 4. *Vicia villosa*

La vicia es una leguminosa anual de crecimiento invernal, que se utiliza en las zonas semiárida y subhúmeda pampeana en asociación con verdeos invernales como un medio natural de recuperar la fertilidad nitrogenada de los suelos, dado su elevado potencial de fijación de nitrógeno atmosférico, además de su alto valor nutritivo (Puricelli, 1996). Suele utilizarse como cultivo sustituto de la alfalfa, en

aquellos sitios donde las condiciones edáficas presentan una limitante productiva para esta especie. La alfalfa requiere, por su sistema radicular, de suelos profundos (1m o más), de textura franco arenosa, bien drenados, de pH cercano a la neutralidad y bien nutrido en macro y micro nutrientes; tosca cercana a la superficie, es decir, horizontes endurecidos y/o densificados son los impedimentos físicos más comunes detectados en la región pampeana (Romero, 2002). La vicia es bastante plástica en cuanto a requerimientos edáficos, crece bien en un amplio rango de tipos de suelos, aunque está mejor adaptada a suelos arenosos y arcillosos. Por su carácter de leguminosa, puede ser cultivada en suelos con bajos contenidos de N sin adición de fertilizantes nitrogenados siempre que el suelo cuente con poblaciones suficientes de *Rhizobium leguminosarum,* su rizobio específico. El crecimiento óptimo de esta leguminosa se logra en suelos con altos niveles de potasio (K) disponible (110 – 130 ppm) siendo los requerimientos de Ca, P y otros minerales menos pronunciados, por ejemplo, 25 – 30 ppm de P (Undersander *et al.*, 1990). Es más tolerante a la acides que otras leguminosas forrajeras, adaptándose a un rango de pH entre 5 y 8 (Siddique and Loss, 1996) y a temperaturas extremas, dentro del área de clima templado, siendo la leguminosa más resistente al frío. Se la puede usar como cultivo de cobertura o como "abono verde"[1]: es la planta ideal para recuperar suelos erosionados (por su rápido crecimiento) y degradados por la agricultura convencional. Entre las ventajas de estos manejos, pueden mencionarse: la vicia fija N atmosférico en grandes cantidades, aportándolo para los cultivos posteriores, mejora las características físicas del suelo (estructura, aireación, capacidad de retención de agua, etc), minimiza la lixiviación de nitratos residuales, agrega materia orgánica al suelo, aumentando el nivel de humus y actividad microbiológica, ayuda a controlar malezas, etc. (Urzúa *et al.* 2001). En caso de campos con superficies pequeñas, donde las rotaciones largas con inclusión de alfalfa son difíciles de realizar, la vicia juega un papel preponderante en la recuperación rápida de la fertilidad.

El rizobio específico de vicia*, R. leguminosarum* bv. *viciae*, es un rizobio de crecimiento rápido que utiliza una amplia gama de fuentes de carbono (hexosas, glicerol, manitol, ácidos orgánicos, sacarosa y lactosa). Sus genes nod están ubicados en un megaplásmido simbiótico, y su ADN contiene entre 59-63 % G+C (Lodeiro *et al.*, 2003).

[1] Los cultivos de cobertura son sembrados entre dos cultivos de cosecha y no son incorporados al suelo (a diferencia de los abonos vedes), pastoreados (a diferencia de los verdeos) o cosechados. Los residuos de los cultivos de cobertura quedan en superficie, liberando los nutrientes contenidos en la biomasa vegetal al descomponerse (Ruffo and Pasons, 2004).

1.5 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)

Las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPB, Plant Growth Promoting Bacteria) representan numerosas especies del suelo que se encuentran asociados con la mayoría de las especies de plantas, sino con todas, y en la mayoría de los ambientes. Entre las especies de PGPB más ampliamente estudiadas se encuentran las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR, Plant Growth Promoting Rhizobacteria) las cuales colonizan la rizósfera y la superficie de las raíces. La rizósfera es la porción del suelo directamente afectada por la actividad de las raíces. La absorción de nutrientes y la exudación de compuestos por las plantas generan un ambiente muy particular en esta zona, muy diferente al del seno del suelo. Estas condiciones determinan que la actividad biológica de este volumen de suelo sea esencialmente diferente a la del suelo no rizosférico y que los procesos que allí ocurren afecten notablemente la adquisición y disponibilidad de nutrientes. En un sentido amplio la rizósfera es considerada como la fina capa de suelo que se adhiere firmemente a las raíces pero que se puede separar por lavado y agitación moderada en agua. A su vez, se sabe emplear el término rizoplano para designar al suelo en contacto íntimo con la superficie de las raíces y que se extrae por una vigorosa agitación de las mismas luego del tratamiento anterior. Al menos que se indique expresamente, al hablar de rizósfera en general estamos incluyendo al rizoplano.

Los géneros más representativos del grupo PGPR son: *Azotobacter, Azospirillum, Pseudomonas, Acetobacter, Bulkholderia y Bacillus.* Éstas pueden actuar en la promoción del crecimiento vegetal por medio de mecanismos directos o indirectos. La promoción directa ocurre cuando la bacteria sintetiza un compuesto que beneficia a la planta o facilita la toma de ciertos nutrientes desde el suelo. Algunos de estos procesos involucran: fijación de N atmosférico; síntesis de sideróforos (compuestos que solubilizan y secuestran el hierro (Fe) y lo proveen a las células de las raíces de las plantas); síntesis de diferentes fitohormonas (compuestos que regulan distintos procesos de crecimiento y desarrollo de la planta) como auxinas, giberelinas, citocininas, etc.; solubilización de minerales no disponibles para la planta, tales como P o sulfatos (SO_4^{2-}); síntesis de enzimas que contribuyen con el crecimiento vegetal. La promoción indirecta ocurre cuando los microorganismos disminuyen o previenen el efecto nocivo de uno o más fitopatógenos en el suelo. Estos procesos involucran: producción de cianidas, antibióticos, antifúngicos, bacteriocinas o la inducción de resistencia sistémica de la planta contra patógenos (Cassan F, 2006).

Existe un gran número de PGPR eficientes en fitoestimulación y como agentes de biocontrol, pero su uso por los productores es restringido por un conocimiento insuficiente de su mecanismo de acción y por no poder obtener formulaciones estables y adecuadas (Bloemberg and Lugtenberg, 2001).

1.5.1 Bacterias Solubilizadoras de Fosfatos

El P es uno de los nutrientes más importantes que limita el crecimiento de las plantas. Muchos suelos agrícolas contienen grandes reservas de P, una considerable parte de las cuales se ha acumulado como consecuencia de aplicaciones regulares de fertilizantes químicos. Sin embargo, una gran proporción de fosfatos inorgánicos solubles añadidos al suelo es rápidamente fijada bajo formas insolubles luego de su aplicación y convertido en "no disponible" para las plantas (Rodríguez and Gonzáles, 1999). La precipitación y fijación de fósforo en los suelos generalmente depende del pH y del tipo de suelo. En suelos ácidos, el P es fijado por hidróxidos y óxidos libres de aluminio (Al) y Fe, mientras que en suelos alcalinos, la fijación se produce por el Ca, causando una baja eficiencia en el P soluble de los fertilizantes. Se sabe que la inoculación de suelo o semillas con bacterias solubilizadoras de fósforo, que se han encontrado en la mayoría de los suelos, mejora la solubilización del fósforo fijado, resultando en mayores rendimientos de los cultivos. A pesar de que las bacterias solubilizadoras de fósforo (al igual que las demás PGPR) permanecen en los suelos, usualmente su número no es lo suficientemente alto como para competir con otras bacterias que están generalmente establecidas en la rizósfera. Por lo tanto, para utilidad agronómica, la inoculación de plantas con estos microorganismos específicos en una concentración mayor que la que comúnmente se encuentra en los suelos es necesaria para tomar ventaja de sus propiedades benéficas y realzar los rendimientos vegetales. La colonización de las raíces es un rasgo importante de las rizobacterias y puede existir cierta especificidad en dicha interacción. Por ello es necesario acudir a métodos de aislamiento de las mejores cepas de los recursos naturales, como así también su detección e identificación (Igual *et al.*, 2001).

2. OBJETIVOS

Como se expuso anteriormente, la optimización de la simbiosis entre leguminosas y rizobios requiere de la presencia en la rizósfera de un número suficientemente elevado de cepas infectivas y competitivas del microorganismo compatible, altamente eficientes al fijar N_2. En situaciones agrícolas estos rizobios pueden provenir de inoculantes comerciales o estar presentes en el suelo en forma natural. Por otra parte, dentro del grupo de las PGPR, las bacterias solubilizadoras de fósforo permiten aumentar los rendimientos de los cultivos, liberando a la solución edáfica el P fijado, dejándolo disponible para las plantas. Dado que existe desconocimiento acerca de las poblaciones de *R. leguminosarum* en la región pampeana, así como de la necesidad de inoculación de vicia, el objetivo general del presente trabajo fue el estudio de la simbiosis *R. leguminosarum* – vicia comparando la respuesta a la inoculación y coinoculación con bacterias PGPR. Para ello se propusieron los siguientes objetivos específicos:

2.1. Aislar y seleccionar cepas nativas de *R. leguminosarum*, a partir de nódulos de vicias no inoculadas de la región y caracterizar dichos aislamientos.

2.2. Aislar, seleccionar y caracterizar bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), específicamente solubilizadoras de fósforo, de la rizósfera de plantas de vicia de la región.

2.3. Analizar diferentes parámetros que permitan evaluar la simbiosis rizobio – vicia en un suelo de la región a nivel invernáculo, utilizando los aislamientos seleccionados y la cepa recomendada por INTA Castelar para la formulación de inoculantes, considerando también la coinoculación con la bacteria PGPR aislada, y comparando con resultados obtenidos al aplicar fertilizantes inorgánicos nitrogenados y fosforados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepa de *R. leguminosarum* de uso comercial

La cepa de *Rhizobium leguminosarum* recomendada por INTA – Castelar para la formulación de inoculantes, denominada D70, fue provista por el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA) de dicha institución. Esta cepa se conservó en medio YEM (tabla 1), en tubos pico de flauta, a 5°C.

Tabla 1. Composición de medio YEM.

Componente	*Concentración g l^{-1}*
Manitol	10,0
Extracto de Levadura	0,5
$MgSO_4.7H_2O$	0,2
K_2HPO_4	0,5
NaCl	0,1
solución 10% $FeCl_3.6H_2O$	1 gota
solución 10% $MnSO_4.4H_2O$	1 gota
Rojo Congo	5 ml solución 0,25%
Ágar	15,0
	Ajustar a pH 6,8

3.2. Aislamientos de nódulos de vicia

Para obtener aislamientos de cepas nativas de *R. leguminosarum* se recolectaron un total de 70 nódulos de plantas de vicia cultivadas (no inoculadas) en cuatro zonas: 1. Campo de la UNLPam; 2. Campo de la Estación Experimental Agropecuaria Anguil del INTA; 3. Campo cercano a la localidad pampeana de Winifreda; 4. Campo cercano a la localidad pampeana de Alpachiri. Los nódulos fueron seleccionados al azar, y separados de la raíz con bisturí, de modo que quedara adherida una pequeña parte de la raíz (Vincent, 1970). Luego fueron colocaron en tubos eppendorff, agrupados según el sitio del que provenían y conservados a 5°C (zonas 1 y 3) y a -18°C (zonas 2 y 4) hasta el momento de realizar los aislamientos. Se siguió la metodología propuesta por CIAT (1988) para el aislamiento de los rizobios de los nódulos: éstos se dejaron sumergidos en agua destilada estéril durante aproximadamente una hora, para que se rehidrataran y perdieran la suciedad que los cubría. La esterilización superficial se realizó en tubos plásticos, con ambos extremas abiertos, uno de los cuales estaba cubierto con malla de gasa. Primeramente se sumergieron los nódulos durante 1 minuto en alcohol al 95%, y se trasladaron a una

solución desinfectante de NaClO al 5%, donde se dejaron durante 3 min. Luego se procedió al lavado de los nódulos con agua estéril durante 1 minuto, tratamiento que se repitió 5 veces. Se tomaron los nódulos con pinza metálica estéril y maceraron sobre la periferia de la placa de Petri correspondiente (previamente preparadas con medio de cultivo YEM agarizado, adicionado del colorante Rojo Congo, tabla 1), sobre la cual se estrió con anza estéril el macerado de cada nódulo. Por último se dejaron incubar las placas a 28°C, en posición invertida durante 3-10 días, hasta observar crecimiento. Se seleccionaron las colonias típicas de rizobios y se subcultivaron en placas de Petri idénticas a las anteriores, para purificar las cepas. Cabe destacar que se asumió que cada colonia aislada representaba una cepa y que cada nódulo contenía sólo una cepa, o bien, si contenía más, que sólo se aisló la más abundante (Chemining and Vessey, 2006). No se distinguió entre nódulos de raíz primaria y de raíces secundarias al momento de la selección, pero si se consideró el aislamiento de aquellos que presentaban coloración rosada al hidratarlos en agua.

3.3. Caracterización de aislamientos de nódulos

Para la caracterización de los aislamientos en este trabajo se realizaron las siguientes experiencias:

3.3.1. Observación microscópica: se utilizó microscopio binocular modelo Janamed 2 Carl Zeiss Jena óptica planométrica para la observación de los aislamientos por contraste de fases, con aumento de 100x, luz verde.

3.3.2. Caracterización morfológica de las colonias desarrolladas en medio YEM: luego de transcurrido el tiempo necesario para observar crecimiento se evaluó: absorción de colorante Rojo Congo, cantidad de goma producida, textura, forma y apariencia de las colonias (según metodología para caracterización de rizobios propuesta por CIAT, 1988).

3.3.3. Tinción de Gram: se utilizó kit GRAM BRITANIA, siguiéndose la metodología indicada en el mismo.

3.3.4. Desarrollo en cultivo líquido y determinación de parámetros de crecimiento de los aislamientos: primeramente se hicieron crecer cada uno de los aislamientos seleccionados y la cepa D70, durante 24 horas, en el medio inóculo (tabla 2) contenido en erlenmeyer de 250 ml, en agitador rotatorio de 250 rpm y 2,5 cm de excentricidad.

Tabla 2. Composición de medios de cultivo para *R. leguminosarum* (Balatti and Jardim Freire, 1996).

Componente	*Concentración Inóculo g l^{-1}*	*Concentración Proceso g l^{-1}*
Sacarosa	5,0	10,0
Extracto de Levadura	2,0	4,0
KH_2PO_4	0,50	0,50
K_2HPO_4	0,50	0,50
NaCl	0,10	0,10
solución 10% $FeCl_3.6H_2O$	0,06 ml	0,06 ml
solución 10% $MnSO_4.4H_2O$	0,06 ml	0,06 ml
KNO_3	0,80	0,80
$MgSO_4.7H_2O$	0,20	0,20
	Ajustar a pH 6,8	Ajustar a pH 6,8

También se evaluó el crecimiento en el mismo medio, suplementado con 0,20 mg l^{-1} de biotina, como factor de crecimiento, puesto que *R. leguminosarum* es dependiente de éste (Balatti and Jardim Freire, 1996). Luego se transfirieron 10 ml de inóculo al medio proceso contenido en un frasco erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de medio. Se continuó el desarrollo durante 48 horas, determinándose el crecimiento celular indirectamente, en base a determinaciones de densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, cada 3 horas. Se expresó como UDO, unidades de densidad óptica absorbidas por la muestra. Se hizo uso de un espectrofotómetro METROLAB 1700-UV-Visible, utilizándose agua destilada como blanco y realizando las determinaciones en celdas de vidrio, sobre las muestras sin modificar, o realizando diluciones, cuando fue necesario. Paralelamente se determinó pH y se realizaron observaciones microscópicas para detectar posibles contaminaciones. Por último se determinaron los siguientes parámetros cinéticos: velocidad específica de crecimiento máxima ($\mu_{máx}$) a partir de la curva de ln UDO en función del tiempo del proceso, tiempo de generación (t_g) a partir de μ ($t_g = \ln 2\ \mu^{-1}$), y n, número de duplicaciones, a partir del tiempo de generación ($n = t\ t_g^{-1}$).

3.3.5. Caracterización por electroforesis de isoenzimas, revelando para α y β esterasas: cada aislamiento fue desarrollado durante 24 horas en medio TY (3 g extracto de levadura, 5 g triptona y 0,87 g de $CaCl_2$ por litro de medio, ajustado a pH 7,2; Beringer, 1974), luego 10 ml aproximadamente fueron centrifugados en Centrífuga Rolco CR 5150 a 7500 rpm y 4°C, durante 30 minutos. El pellet así obtenido fue resuspendido en solución 0,85% de NaCl. Posteriormente la suspensión fue

centrifugada a 15000 rpm, utilizando centrífuga EPPENDORF 5414 durante 10 minutos, y el pellet así obtenido fue lavado con buffer 0,1 M de Tris-HCl, pH 7,2, conteniendo 5mM de $MgCl_2$, 15% de glicerol y 0,1% de β-mercaptoetanol. Luego del lavado, las bacterias fueron nuevamente sedimentadas por centrifugación y resuspendidas en 0,5 ml del mismo buffer Tris-HCl conteniendo 1 mg ml^{-1} de lisozima. La suspensión fue incubada a temperatura ambiente por 10 minutos, transcurridos los cuales se centrifugó nuevamente. El sedimento fue resuspendido en buffer de sonicación, 0,1 M Tris- HCl pH 8,8, conteniendo 15% de glicerol y sometido a la acción de 6 pulsos de sonicador KONTES Microsonic Cell Disrupter, de 30 segundos cada uno. La suspensión fue entonces centrifugada, el sobrenadante separado y almacenado a -18°C, para su posterior análisis electroforético (Lemos, 1994). Se realizó Electroforesis en Geles de Poliacrilamida (PAGE) para separar las isoenzimas presentes en los extractos antedichos. La concentración de poliacrilamida para la placa de electroforesis fue de 5% para el gel concentrador y 10% para el gel separador (tabla 3). Se colocó la placa de electroforesis en la cuba conteniendo solución reguladora de electrodos (0,012M Tris; 0,095M Glicina; pH 8,8). Se colocó un volumen de 80 µl de extracto en cada pocillo. La electroforesis se corrió con un Voltaje constante de 200 V, utilizándose azul de bromofenol como indicador del frente de corrida. Las enzimas fueron detectadas en el gel de acuerdo al método propuesto por Selander *et al.* (1986), los geles fueron tratados con 100 ml de buffer fosfatos 0,1 M, pH 6,2, conteniendo 100 mg de Fast Blue y 60 mg de α-naftil acetato y 40 mg de β-naftil acetato, previamente disueltos en 0,5 ml de acetona y luego incubados a temperatura ambiente con agitación lenta y continua hasta que desarrollaron suficiente coloración en las bandas, aproximadamente 30 minutos. Luego se lavaron los geles con 300 ml de solución decolorante (30% v/v etanol; 5% v/v ácido acético). Los geles fueron fotografiados para su análisis posterior.

Tabla 3. Concentración de los geles de poliacrilamida concentrador (superior) y separador (inferior)

	Gel concentrador 5%	*Gel separador 10%*
Tris-HCl 2.25 M, pH 8.8;	13,63%	16,67%
Acrilamida –bisacrilamida 30:0,8%	16,48%	33,35%
Agua desionizada	68,40%	48,72%
TEMED	0,25%	0,11%
Persulfato de amonio	1,24%	1,15%

3.4. Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fósforo

Las bacterias solubilizadoras de fósforo fueron aisladas de la rizósfera de plantas de vicia del Campo de la UNLPam. Se tomaron las muestras vegetales acompañadas del pan de suelo circundante en bolsas de polietileno negro. Inmediatamente se cortó la parte aérea de las plantas y se agitó la raíz con movimientos suaves obteniendo al menos 10 g de suelo rizosférico, que fue inmediatamente adicionado a un matraz erlenmeyer con 90 ml de agua estéril, el cual se agitó durante 15 minutos en agitador rotatorio de 250 rpm y 2,5 cm de excentricidad. Luego, a partir de esta primera suspensión y en condiciones asépticas, se realizaron diluciones decimales desde 10^{-3} a 10^{-6} (Cassan, 2006). Se aplicó 0,1 ml de las diluciones obtenidas en placas de Petri conteniendo medio de cultivo NBRIP (tabla 4) (National Botanical Research Institute´s Phosphate; Nautiyal, 2000).

Tabla 4. Composición del medio de cultivo NBRIP

Componentes	*Concentración g l^{-1}*
Glucosa	10,00
$Ca_3(PO_4)_2$	5,00
$MgCl_2.6H_2O$	5,00
$MgSO_4.7H_2O$	0,25
KCl	0,20
$(NH_4)_2SO_4$	0,10
Ágar	15,00
	Ajustar a pH 7,0

Se extendió el inóculo en toda la superficie de la placa de Petri con espátula de vidrio y se dejó incubar durante 5 días a 28°C, hasta aparición de halo translúcido. Luego se subcultivaron en el mismo medio las colonias que presentaron dicha característica. Se seleccionó para la realización del ensayo en invernáculo aquel aislamiento que formaba un halo translúcido mayor al resto y se lo denominó SP.

3.5. Caracterización de bacterias solubilizadora de fósforo

Para la caracterización del aislamiento utilizado en el ensayo en invernáculo se realizaron las siguientes experiencias:

3.5.1. Observación microscópica: ídem 3.3.1

3.5.2. Caracterización morfológica de las colonias desarrolladas en medio NBRIP: metodología análoga a 3.3.2. pero utilizando medio de cultivo NBRIP (tabla 4)

3.5.3. Tinción de Gram: ídem 3.3.3.

3.5.4. Crecimiento en medio King A y King B: Frecuentemente las especies del género *Pseudomonas* producen solubilización de fosfatos del suelo. Como otras *Pseudomonas, P. aeruginosa* secreta una variedad de pigmentos, como piocianina (azul verdoso), fluoresceína (amarillo verdoso fluorescente) y piorubina (rojo pardo). King *et al.* (1954) desarrollaron los medios Pseudomonas Agar P (medio King A) para mejorar la producción de piocianina y piorubina y Pseudomonas Agar F (medio King B) para la fluoresceína. De acuerdo a la producción o no de pigmentos fluorescentes, estos medios permiten la detección y diferenciación de *P. aeruginosa* de otras *Pseudomonas.* Los medios se prepararon suspendiendo 46,4 g del polvo para King A y 38,0 g del polvo para King B (tabla 5) en un litro de agua destilada. Se agregaron 10 ml de glicerina y se calentó con agitación constante para homogeneizar, se llevó a ebullición y se esterilizó. Se ensayó luego crecimiento y producción de pigmentos del aislamiento SP, incubado a 28°C durante 5 días.

Tabla 5. Composición de medios King A (Ágar P) y King B (Ágar F).

Componentes King A	*Concentración g l^{-1}*	*Componentes King B*	*Concentración g l^{-1}*
Peptona de gelatina	20,0	Tripteína	10,0
K_2SO_4	10,0	Peptona de carne	10,0
$MgCl_2.6H_2O$	1,4	K_2PO_4	1,5
Ágar	15,0	$MgSO_4$	1,5
	pH=7	Ágar	15,0
			pH=7

3.5.5. Curva de crecimiento de la bacteria SP en medio NBRIP (UFC ml^{-1} vs. tiempo): se desarrolló la bacteria SP durante 72 horas en medio NBRIP a 28°C, en agitador rotatorio de 250 rpm y 2,5 cm de excentricidad. Se midió la variación de la concentración celular mediante recuento en placas de Petri con medio NBRIP agarizado, aplicando las diluciones convenientes (10^{-5} a 10^{-9}). Simultáneamente se determinaron los valores de pH correspondiente a cada punto de la curva. Las determinaciones se realizaron durante intervalos de 12 horas.

3.5.6. Curva de solubilización de fosfatos en medio líquido NBRIP: La estimación cuantitativa de la solubilización de fosfatos en medio líquido fue llevada a cabo utilizando frascos erlenmeyer (500 ml), que contenían 100 ml de medio, los cuales fueron inoculados con la cepa seleccionada. La determinación se realizó por duplicado. Se utilizó como control negativo un medio en las mismas

condiciones, autoclavado y no inoculado. Los frascos se incubaron por 72 horas a 28°C, en agitador rotatorio de 250 rpm y 2,5 cm de excentricidad. De los cultivos fueron recolectados aproximadamente 3 ml de cada uno, cada 12 horas; las bacterias y el fosfato insoluble fueron separados por centrifugación del medio de cultivo, que además luego fue filtrado. Para la cuantificación de fosfatos en el cultivo sobrenadante se utilizó la técnica espectrofotométrica basada en el siguiente principio: el molibdato amónico y el tartrato antimónico potásico reaccionan en medio ácido con ortofosfato para formar un ácido heteropoliácido fosfomolíbdico (o molibdofosfórico) que se reduce a azul de molibdeno, de color azul intenso por acción del ácido ascórbico; el compuesto reducido y coloreado presenta un pico de absorbancia a 882 nm, que se utiliza para las determinaciones espectrofotométricas. Se utilizó espectrofotómetro METROLAB 1700 UV-Visible para la cuantificación. Se siguió la metodología propuesta por la Cátedra de Química Analítica II, del Departamento de Química, FCEyN, UNLPam (2006).

3.6. Características del suelo utilizado

El suelo seleccionado para el ensayo correspondía a una zona medanosa del Campo de la UNLPam, el cual nunca había sido cultivado y sólo soportaba caldenes y olivillo.

3.6.1. Análisis físico – químico: de acuerdo a las metodologías propuestas por la Cátedra de Edafología, de la Facultad de Agronomía de la UNLPam (2006), se realizaron las siguientes determinaciones físico–químicas del suelo utilizado: pH, porcentaje de materia orgánica, concentración meq l^{-1} de Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+} y PO_4^{3-} (utilizando solución extractiva ácida de Bray y Kurtz), densidad aparente y porcentaje de humedad correspondiente a Capacidad de Campo (CC) y Punto de Marchitez Permanente (PMP).

3.6.2. Número más probable de rizobios (NMP): El test de infección de plantas "Número más probable" fue utilizado para cuantificar los rizobios capaces de nodular vicia en el suelo colectado. Para ello se prepararon una serie de 6 diluciones acuosas 1/10 de la muestra de suelo considerada (las diluciones fueron 10^{-1} hasta 10^{-6}) y se inocularon cuatro plántulas de vicia con cada una de ellas, utilizando 1 ml de la suspensión correspondiente. Las plántulas habían sido colocadas en condiciones estériles en tubos de ensayo de 2,5 cm de diámetro por 20 cm de alto, conteniendo 20 ml de medio Jensen agarizado (tabla 6)

Tabla 6. Composición del medio de Jensen

Componentes	*Concentración g l^{-1}*	*Solución Stock*	*Concentración g l^{-1}*
$CaHPO_4$	1,0	H_3BO_3	1,24
K_2HPO_4	0,2	Na_2MoO_4	0,04
$MgSO_4.7H_2O$	0,2	$CuSO_4.5H_2O$	0,04
NaCl	0,2	KCl	0,164
$FeCl_3$	0,1	$CaCl_2$	0,004
Solución stock	5 ml		

Los tubos fueron colocados en cámara de crecimiento, a 25°C y con 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Luego de 4 semanas se evaluó nodulación (positiva o negativa) y se calculó el NMP de rizobios por gramo de suelo.

3.7. Evaluación de la simbiosis rizobio – vicia en macetas. Efectividad simbiótica

Para la evaluación de la simbiosis se compararon los resultados de los parámetros obtenidos al inocular las plantas de vicia con la cepa de referencia, *R. leguminosarum* D70, y con dos aislamientos nativos (N_4 y N_{17}) obtenidos durante este trabajo, siguiendo la metodología detallada en el inciso 3.2. Se probó además la coinoculación de cada uno de estos rizobios con la cepa solubilizadora de fósforo seleccionada (SP). El estudio de la simbiosis se realizó en primera instancia a nivel de cámara de crecimiento, en tubos de ensayo de 2,5 cm de diámetro por 20 cm de alto (en la figura 5 se muestra el rápido desarrollo de las plantas en estos tubos durante 5 días); seguidamente se probó el desarrollo de la leguminosa en Jarras de Leonard (CIAT, 1988) utilizando envases plásticos y perlita como soporte. No se obtuvieron resultados adecuados con estas técnicas. El ensayo definitivo se llevó a cabo a nivel de invernáculo.

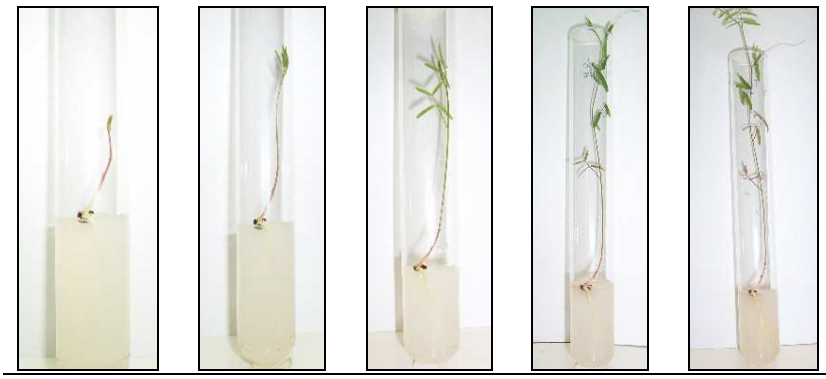


Figura 5. Evolución de plantas de vicia en tubos para ensayo en cámara climatizada durante 5 días.

3.7.1. Condiciones experimentales: las semillas utilizadas fueron provistas por personal de la Agencia Santa Rosa, Unidad dependiente de la Estación Experimental Agropecuaria EEA Anguil del INTA. Dado que la muestra era heterogénea, es decir, contenía diferentes variedades de semillas de vicia, se seleccionaron, de acuerdo a sus características morfológicas, aquellas pertenecientes a la variedad villosa (Amieva and Gutierrez, 2001; Martínez, 2007).

Para evitar posibles contaminaciones con rizobios, las semillas fueron esterilizadas en superficie, por lavados sucesivos con alcohol 95%, NaClO 5% y agua estéril, 5 veces, durante 1, 3 y 1 minuto cada uno, respectivamente. Se colocaron luego en placas de Petri estériles, que contenían un disco de papel de filtro, el cual se humedeció con agua destilada estéril. Se cubrieron para evitar el contacto con la luz y por último se colocaron a germinar a 28°C.

El suelo fue secado al aire, tamizado por malla de 1 cm y colocado en macetas plásticas de 10 cm de diámetro por 50 cm de alto. En cada maceta, que contenía 3,40 Kg de suelo, se implantaron 4 semillas pregerminadas como se indicó anteriormente, sobre el suelo húmedo. Después de una semana se seleccionaron las dos plántulas más vigorosas y las restantes fueron desechadas. El diseño fue completamente al azar, con 5 repeticiones. Los tratamientos que se llevaron a cabo fueron: 1.Testigo; 2. Fertilizado con N; 3. Fertilizado con N y P; 4. Inoculado con D70; 5. Inoculado con D70 y bacteria SP; 6. Inoculado con N_4; 7. Inoculado con N_4 y bacteria SP; 8. Inoculado con N_{17}; 9. Inoculado con N_{17} y bacteria SP. La inoculación con el/los microorganismo/s correspondiente/s a cada tratamiento se realizó 48 horas después de la siembra. Los inoculantes rizobianos correspondían a cultivos de las bacterias D70, N_4 y N_{17} crecidos en medio para *R. leguminosarum* (Balatti and Jardim Freire, 1996) durante 48 horas en agitador rotatorio de 250 rpm y 2,5 cm de excentricidad. El inoculante de la bacteria SP correspondía a un cultivo de dicha bacteria en medio NBRIP desarrollado en las mismas condiciones. Según los valores de recuento obtenidos, la concentración de microorganismos con que fue inoculado cada tratamiento fueron los siguientes: D70: 7,0 10^{10} UFC planta^{-1}; N_4: 3,8 10^9 UFC planta^{-1}; N_{17}: 4,1 10^{10} UFC planta^{-1}. Para fertilización nitrogenada se utilizó solución de urea 7,88 g l^{-1}, la cual se aplicó en 5 dosis de 5 ml cada una, sucesivamente cada 15 días desde el momento de la siembra, de modo de completar una dosis acumulada de 150 Kg N ha^{-1}. Para la fertilización fosforada se utilizó solución de

K_2HPO_4 16,87 g l^{-1}, la cual se aplicó en 2 dosis de 10 ml cada una, la primera a los 15 días de la siembra y la segunda a los 30 días de aquella, de modo de completar una dosis acumulada de 100 Kg P ha^{-1}. Durante el tiempo que duró el ensayo, se mantuvo la humedad constante mediante riegos periódicos con agua. Las macetas se rotaron frecuentemente, para asegurar homogeneidad de condiciones en la totalidad de los tratamientos. Se colocaron guías de madera para permitir que las plantas se sujetaran a ellas. Transcurridos 3 meses luego de la siembra se cosecharon las plantas, cortando los tallos al nivel del suelo.

3.7.2. Parámetros de efectividad simbiótica: se utilizaron como tales las determinaciones sobre parte aérea de las plantas de peso seco (secado en bolsas de papel, en estufa a 60°C, hasta peso constante, aprox. 48 horas), porcentaje de N sobre materia seca y porcentaje de proteínas (multiplicando el porcentaje de N por factor de conversión 6,25). Para esto último, cada muestra fue molida, digestada con H_2SO_4 concentrado y catalizador (K_2SO_4 y HgO amarillo, 24:1 m/m), destilada y titulada con HCl 0,09952 N, utilizando un equipo automático (TECATOR KJELTEC AUTO 1030 ANALIZER). Todas las determinaciones se realizaron en forma conjunta sobre las dos plantas crecidas en una misma maceta. La determinación de N se realizó por duplicado. El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante Test de Comparación de Medias D.G.C., utilizando la versión 1.1/Profesional de InfoStat. (Di Rienzo *et al.*, 2002)

3.7.3. Parámetro de competitividad de las bacterias inoculadas frente a cepas nativas: se utilizó como tal el porcentaje de ocupación nodular. De las raíces de las plantas de cada uno de los tratamientos se tomaron 45 nódulos al azar, los que se almacenaron a 5°C en placa de Petri humedecida y luego se procedió al aislamiento de las bacterias que los ocupaban, tal como se describió anteriormente (inciso 3.2). Se determinó para cada tratamiento el porcentaje de recuperación de rizobios viables de los nódulos. La técnica utilizada para determinar la proporción de nódulos ocupados por la cepa del inoculante correspondiente, según cada tratamiento analizado fue la electroforesis de isoenzimas (tal como se describió anteriormente, inciso 3.3.5). Las cepas D70, N_4 y N_{17}, fueron utilizadas como referencia en cada uno de los geles de poliacrilamida. La competitividad de las diferentes cepas con respecto a las nativas se determinó mediante el cálculo

del porcentaje de ocupación nodular, definido como la proporción de nódulos ocupados por la cepa del inoculante con respecto al total de nódulos que contenían rizobios viables.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Aislamientos de nódulos de vicia

Del total de plantas de vicia recolectadas en la región, se tomaron 71 nódulos, los cuales fueron tratados para aislar las bacterias que contenían. En la tabla 7 se consignan los resultados obtenidos:

Tabla 7. Número de nódulos tratados de cada lugar de procedencia y su correspondiente porcentaje de recuperación de bacterias viables.

Lugar de procedencia	*Número de nódulos tratados*	*Recuperación de bacterias viables (medio YEM) (%)*
Campo UNLPam	18	39
Winifreda	23	9
Anguil	20	0
Alpachiri	10	0

En aquellos casos en que los porcentajes de recuperación fueron nulos, puede suponerse que se debió a que los nódulos no fueron inmediatamente tratados o que no se almacenaron en condiciones óptimas, que permitiesen la conservación de la viabilidad de los rizobios. Del total de aislamientos obtenidos se seleccionaron dos (N_4 y N_{17} provenientes de Campo de la UNLPam y Winifreda respectivamente) por su desarrollo óptimo en medio YEM para ser contrastados con la cepa comercial D70 en el ensayo en invernáculo. De aquí en adelante se trabajó sólo con estos dos aislamientos.

4.2. Caracterización de aislamientos de nódulos y comparación con la cepa D70

Los aislamientos nativos N_4 y N_{17} resultaron ser, al igual que la cepa D70, bacilos móviles Gram negativos. Ambos crecieron abundantemente en medio YEM agarizado (aunque N_{17} desarrolló más rápidamente) formando colonias con apariencia acuosa que no absorbieron el colorante rojo congo cuando el medio fue adicionado del mismo. Las colonias de N_4 resultaron con textura cremosa y las de N_{17} con textura elástica y abundante producción de goma. La cepa comercial D70 forma en este medio colonias de textura elástica característica. Tanto la cepa D70 como los aislamientos nativos formaron colonias elevadas y redondeadas en la sección vertical. En cuanto al desarrollo en medio líquido, se obtuvieron las curvas de crecimiento que se muestran en la figura 6. Durante el desarrollo de los microorganismos en el medio proceso, en todos los tratamientos el pH se mantuvo cercano a la neutralidad, lo cual permite descartar posibles contaminaciones.

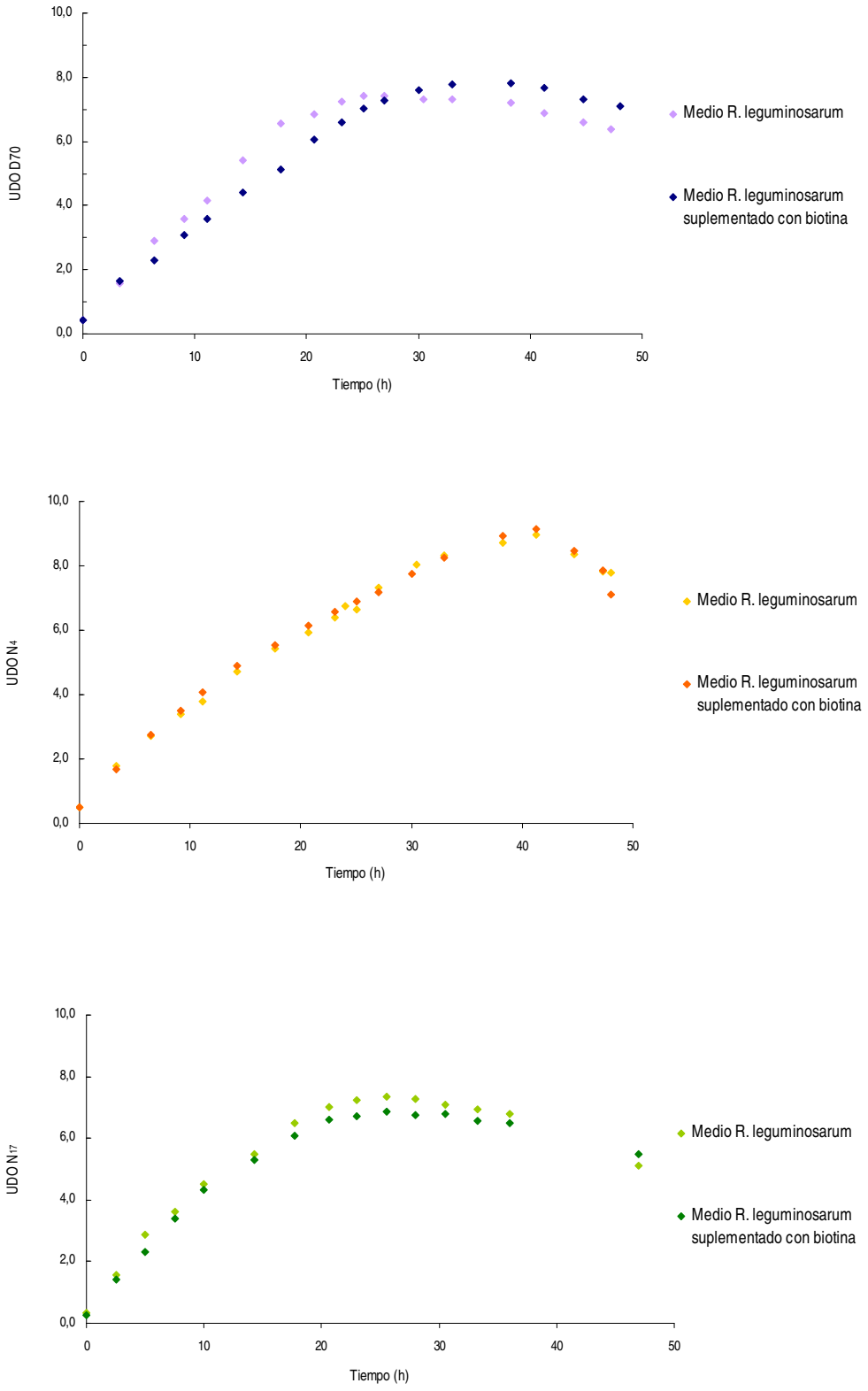


Figura 6. Curvas de crecimiento (UDO vs. tiempo)

Se construyeron las gráficas ln UDO vs. tiempo (figura 7) para determinar los parámetros de crecimiento de cada microorganismo en el medio para *R. leguminosarum* (Balatti and Jardim Freire, 1996) y en el mismo medio suplementado con biotina.

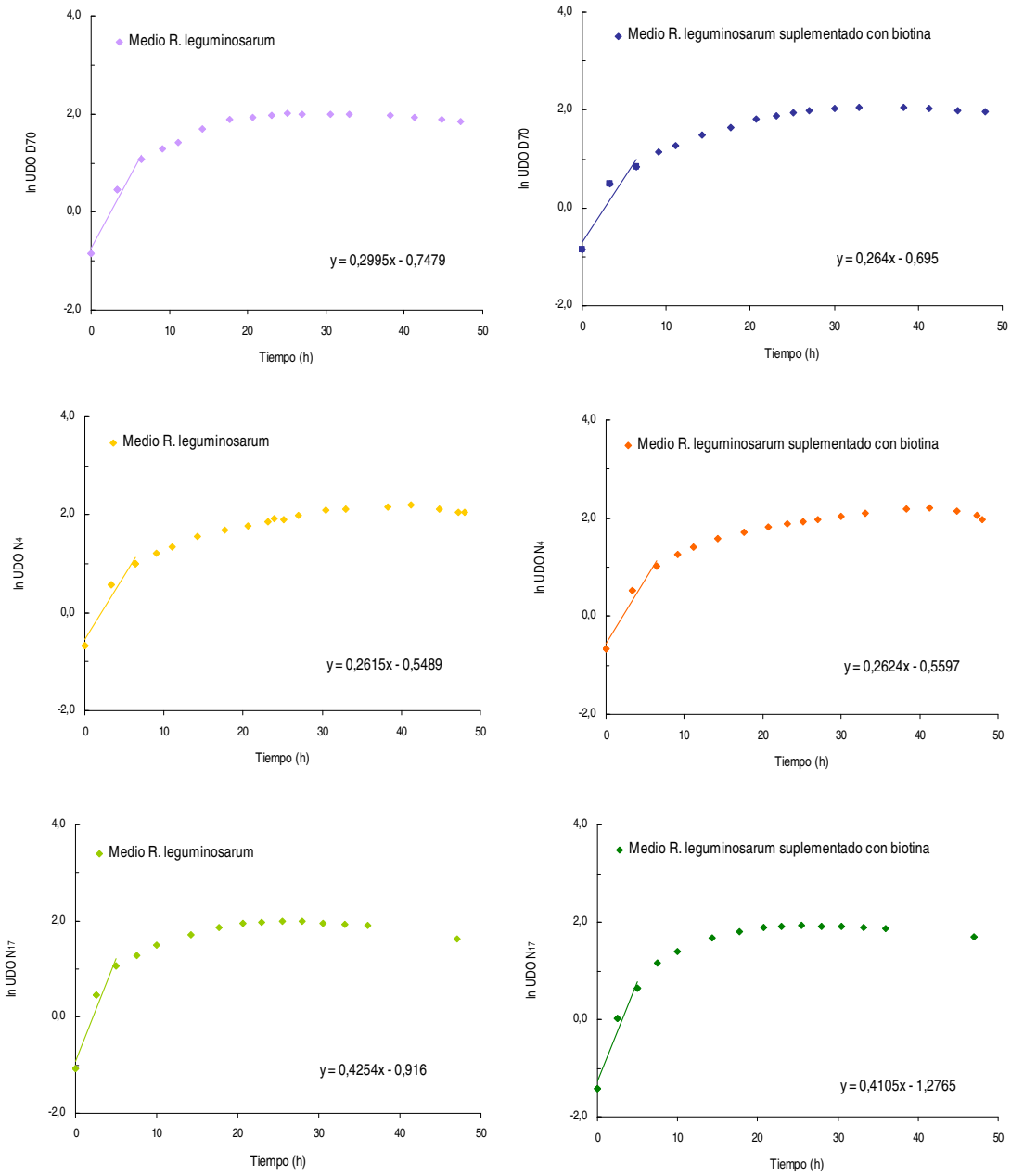


Figura 7. Curvas de crecimiento (ln UDO vs. tiempo)

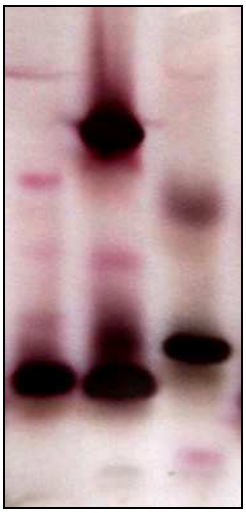
A partir de la información que brindan las curvas de las figuras 6 se calcularon algunos parámetros de crecimiento, tales como velocidad específica de crecimiento máxima ($\mu_{máx}$), tiempo de generación (t_g), y número de duplicaciones, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Parámetros de crecimiento de las bacterias en estudio

	Medio proceso			*Medio proceso suplementado con biotina*		
Cepa/ aislamiento	$\mu_{máx}$ (h^{-1})	t_g (h)	n duplicaciones	$\mu_{máx}$ (h^{-1})	t_g (h)	n duplicaciones
D70	0,300	2:18	2,765	0,264	2:37	2,438
N_4	0,262	2:39	2,414	0,262	2:38	2,423
N_{17}	0,425	1:38	3,928	0,411	1:41	3,786

Los valores de $\mu_{máxima}$ y de tiempo de generación de las bacterias D70 y N_4 corresponden al rango de valores señalado por la bibliografía, 2- 4 h^{-1}, para rizobios de crecimiento rápido (Ballati and Jardim Freire, 1996). El aislamiento N_{17}, sin embargo, mostró una velocidad específica de crecimiento sensiblemente mayor. La adición de biotina como factor de crecimiento no modificó en forma apreciable el crecimiento en medio líquido de las bacterias.

Mediante electroforesis de isoenzimas se confirmó que los aislamientos nativos eran diferentes entre sí, y a su vez, distintos de la cepa comercial D70, dado que los patrones de bandas eran disímiles (Figura 8.)



D70 N_4 N_{17}

Figura 8. Patrones de bandas de PAGE de las cepas nativas aisladas de nódulos de vicias de la región y de la cepa comercial D70.

Con el objeto de poder visualizar una mayor cantidad de bandas, la incubación de los geles para desarrollar color se realizó durante, aproximadamente, 15 minutos adicionales al tiempo señalado por la técnica. Como resultado de ello las bandas más profusas se tiñeron en exceso, dando lugar a las manchas que se ven en la figura 8. Para lograr una mejor resolución, es decir, geles con bandas más nítidas, sería necesario realizar las electroforesis en geles de longitud superior a los que se utilizaron en este ensayo, permitiendo de este modo, una mayor separación de las bandas.

4.3. Aislamiento de cepas solubilizadoras de fósforo

Del total de aislamientos rizosféricos realizados, se seleccionó aquel que presentaba mayor halo de solubilización de fosfatos en el medio NBRIP y se lo denominó SP (figura 9).

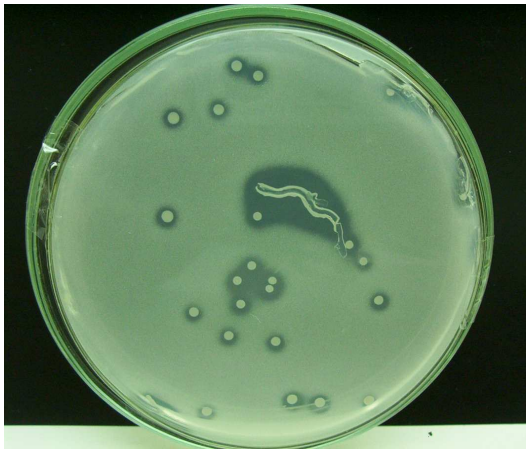


Figura 9. Halo producido en la placa de Petri por la solubilización de los fosfatos del medio de cultivo por la bacteria SP.

4.4. Caracterización de cepas solubilizadoras de fósforo

De la observación microscópica del aislamiento SP se dedujo que se trataba de bacilos móviles, resultando ser Gram negativos en la tinción de Gram. En medio NBRIP la bacteria creció abundantemente, como así también en medio YEM, formando colonias pequeñas y gelatinosas, redondeadas en sección vertical. Además creció en medio King A y King B sin producir fluorescencia en ninguno de ellos, hecho que descarta la posibilidad de que el aislamiento pertenezca a la especie *Pseudomonas aeruginosa*, aunque podría tratarse de otra especie del mismo género. En la figura 10 puede observarse que el aislamiento produce abundante solubilización de fosfatos en medio NBRIP líquido.

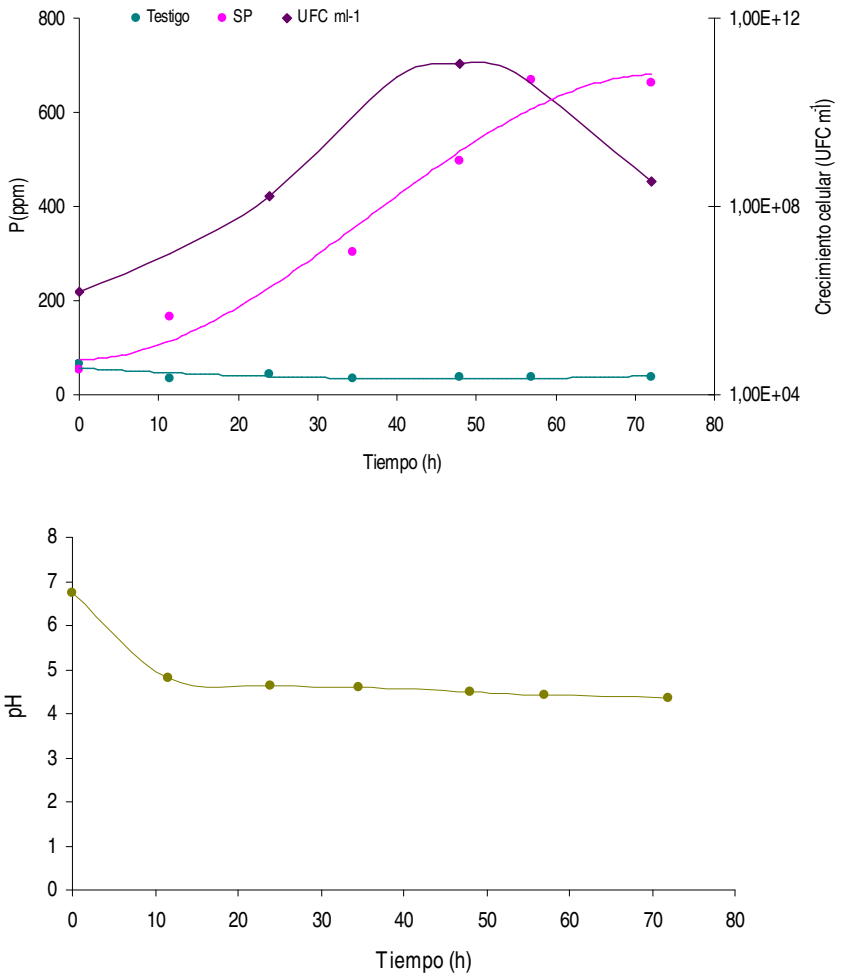


Figura 10. Evolución de la concentración celular (UFC ml^{-1}), pH y concentración de P en solución de un cultivo de la bacteria SP en medio NBRIP.

Resulta interesante el hecho de que la concentración de fosfatos en solución aumente en forma exponencial hasta llegar a una meseta, punto que se corresponde con la fase de muerte de la curva de crecimiento del microorganismo. Esto indica que efectivamente la solubilización de fosfatos está estrechamente relacionada al metabolismo bacteriano. Se observa además una brusca disminución inicial del pH del medio (desde 6,8 hasta 4,8 en las primeras 12 horas de desarrollo), que luego se hace menos pronunciada, llegando a valores de pH de 4,3 a las 72 horas. A partir de estos resultados, puede deducirse que la producción de metabolitos microbianos resulta en una disminución del pH, que juega el rol más importante en la solubilización (Nautiyal *et al.*, 2000); podemos proponer que este aislamiento, a través de su actividad metabólica, produce ácidos orgánicos, los cuales directamente disuelven los

fosfatos de calcio, o bien, quelan iones Ca^{2+}, para liberar al fósforo a la solución. En futuros ensayos se podía realizar el estudio de la capacidad de solubilización de fósforo de este aislamiento por otros mecanismos (distintos de la disminución del pH), como por ejemplo la capacidad de liberar exo-enzimas de actividad hidrolítica sobre formas orgánicas del fósforo del suelo.

4.5. Características del suelo utilizado

4.5.1. Análisis físico químico: Los resultados obtenidos se consignan en la tabla 9.

Si bien no se llevo a cabo la determinación de nitratos, puede predecirse, por el bajo porcentaje de materia orgánica determinada, que el suelo era pobre en nitratos. Además, también se realizó el análisis textural cualitativo del suelo, dando como resultado, textura arenosa. Se puede con estos análisis garantizar que el suelo utilizado era apto para el desarrollo de vicia, dado que la bibliografía señala, que en cuanto a requerimientos edáficos, esta leguminosa es una especie que desarrolla satisfactoriamente en un amplio rango de condiciones edáficas aunque está mejor adaptada a suelos arenosos y arcillosos, prefiere suelos moderadamente fértiles y de pH cercanos al neutro (6,0 – 7,5), y además, puede crecer en suelos pobres en N sin necesidad de fertilización nitrogenada (Miller and Hoveland, 1995; Undersander *et al.*, 1990).

Tabla 9. Análisis físico-químico del suelo utilizado.

Parámetro	*Resultado*
pH	6,90
Materia Orgánica	1,11%
Na^+	13,2 meq/100g
K^+	0,2 meq/100g
Ca^{2+}	7,5 meq/100g
Mg^{2+}	1,5 meq/100g
PO_4^{3-} Bray y Kurtz	7,44 µg/g
Capacidad de Campo (CC)	23,1% humedad
Punto de Marchitez Permanente (PMP)	4,49% humedad
Densidad aparente	1,11 g/cm^3

4.5.2. Número más probable de *R. leguminosarum* del suelo (NMP): En el suelo analizado no se detectaron rizobios capaces de nodular vicia por la técnica de NMP en cámara climatizada; sin embargo, se observó abundante nodulación de las plantas testigo (sin inocular) en la experiencia

llevada a cabo en invernáculo. Varios autores han considerado que los aislamientos de rizobios de plantas que han sido crecidas bajo condiciones artificiales no proveen una representación fiel de la población del suelo (Moawad *et al.*, 1984; Dowdle and Bohlool, 1985, Damezas and Bottomley, 1987; Duodu *et al.*, 2006). Esto puede explicarse desde diferentes puntos de vista. En primer lugar, es necesario considerar que aunque la inoculación con extractos de suelos resulte en nodulación sub-óptima o ausente en el experimento en cámara climatizada, podría esperarse mejor nodulación en el campo (o aún en invernáculo), dado que las raíces de las plantas son capaces de explorar un volumen mucho mayor de suelo, a través del cual los rizobios están dispersados (Ballard *et al.*, 2004). Además, la técnica NMP es aplicable a suelos con poblaciones moderadas de rizobios (del orden de al menos 100 g^{-1}), por lo cual, sólo podríamos asegurar que el suelo analizado contiene menos de dicha proporción. Puede no ser detectada aún sin dilución del suelo una población escasa (del orden de 10 g^{-1}). Es necesario considerar que este método depende de la capacidad de un rizobio específico para producir nódulos en una especie determinada y presupone que una sola célula de *Rhizobium* agregada a la planta huésped induce en los alrededores de la raíz una población suficiente para causar la nodulación. Sin embargo, la existencia de un ambiente desfavorable para la supervivencia, multiplicación o nodulación de los rizobios en las condiciones de la experiencia constituye una limitación propia del método, que puede ocasionalmente conducir a resultados inexactos. Por ejemplo, cuando la muestra contiene una cantidad suficientemente grande de otros microorganismos como para afectar la colonización de la plántula, pueden originarse serias interferencias en cuanto a las relaciones cuantitativas esperadas entre el número de rizobios y la formación de nódulos. Más seria es la situación cuando la cantidad de rizobios es demasiado pequeña para revelar ese efecto (Thompson y Vincent, 1967). Desde otro punto de vista, puede considerarse que esta aparente ausencia de rizobios nodulantes de vicia en el suelo, pudo deberse a una falla en el diseño de la experiencia, dado que la vicia es una leguminosa de semilla lo suficientemente grande para desarrollarse adecuadamente en tubos de ensayo de la medida que se utilizaron.

4.6. Evaluación de la simbiosis rizobio – vicia en macetas. Efectividad simbiótica

Parámetros de efectividad simbiótica: en la figura 11 se muestra la distribución de las macetas dentro del invernáculo.

Figura 11. Ensayo en invernáculo

En la tabla 10 y la figura 12 se muestran los valores medios y sus desvíos estándares (D.E.) de peso seco de parte aérea (PS), expresado por maceta (2 plantas), porcentaje de nitrógeno (N) y porcentaje de proteína de los distintos tratamientos. Todos los tratamientos lograron simbiosis efectivas, con producción de biomasa y concentración de nitrógeno (o proteína) equivalente al tratamiento fertilizado con nitrógeno mineral, en el experimento en invernáculo de 12 semanas.

Tabla 10. Resultados de peso peco de parte aérea (PS), porcentaje de nitrógeno (N), y porcentaje de proteína bajo condiciones de invernáculo. Letras diferentes indican diferencias significativas, Test de diferencia de medias DGC (α: 0.05)

Tratamiento	*Media ± D.E PS (g)*		*Media ± D.E N (%)*		*Media ± D.E Proteína (%)*	
T	3,14 ± 0.44	a	2,36 ± 0.44	a	14,75 ± 2,75	a
N	3,21 ± 0.36	a	2,72 ± 0.30	a	17,00 ± 1,88	a
D 70	2,95 ± 0.32	a	2,27 ± 0.43	a	14,19 ± 2,69	a
N 4	3,04 ± 0.33	a	2,28 ± 0.24	a	14,25 ± 1,50	a
N17	3,06 ± 0.14	a	2,00 ± 0.27	a	12,50 ± 1,69	a
N17+SP	3,30 ± 0.28	a	2,23 ± 0.24	a	13,94 ± 1,50	a
N4 + SP	3,72 ± 0.57	b	2,10 ± 0.50	a	13,13 ± 3,13	a
D 70 + SP	3,87 ± 0.58	b	2,35 ± 0.09	a	14,69 ± 0,56	a
N + P	5,38 ± 0.44	c	2,30 ± 0.50	a	14,38 ± 3,13	a

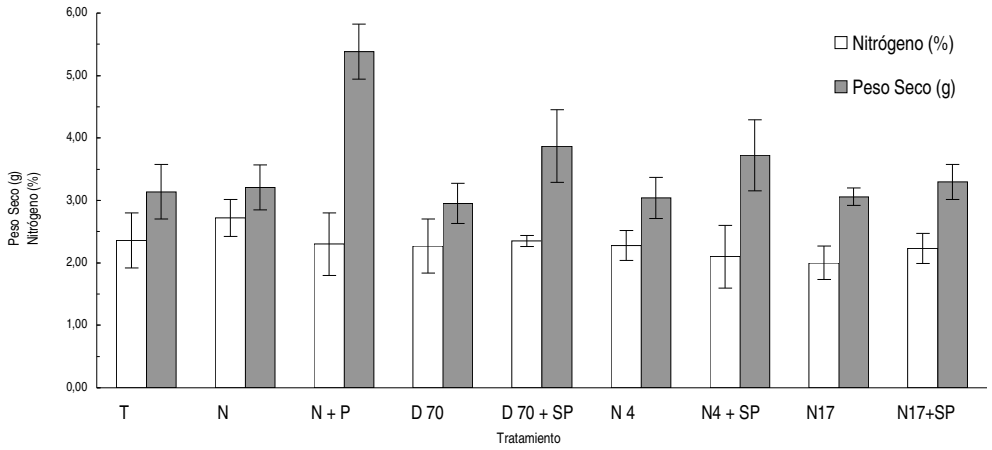


Figura 12. Resultados de peso seco de parte aérea (PS), porcentaje de nitrógeno (N), bajo condiciones de invernáculo.

No se observan diferencias significativas en los resultados de peso seco entre los tratamientos que fueron inoculados, ni entre éstos y aquellos provenientes de las plantas que fueron noduladas por las poblaciones naturales (testigos). El análisis de las cifras y los gráficos muestra un efecto significativo de la fertilización fosforada sobre el peso seco de parte aérea, indicando una adecuada correspondencia con la bibliografía, que indica que el fósforo es el principal requerimiento nutricional de esta especie (Farmer, s/f). Se observan diferencias significativas entre los tratamientos que fueron inoculados sólo con la bacteria nodulante y aquellos que se coinocularon además con la bacteria solubilizadora de fósforo. El porcentaje de incremento del peso seco de la parte aérea por efecto de la coinoculación con la bacteria SP puede observarse en la figura 13.

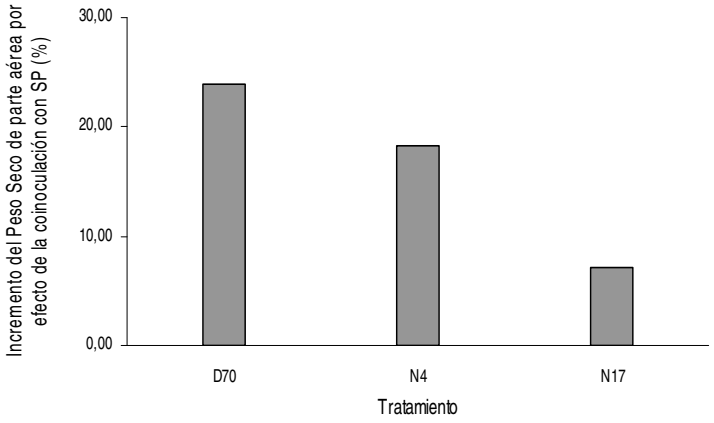


Figura 13. Incremento del peso seco de la parte aérea de los distintos tratamientos por efecto de la coinoculación con bacterias SP

4.7. Ocupación nodular:

Se determinó el porcentaje de recuperación de rizobios viables de los nódulos, extraídos de plantas testigo e inoculadas con las cepas D70, N_4 y N_{17}, como la proporción de aislamientos viables sobre el total de nódulos procesados. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Porcentaje de recuperación de rizobios viables de nódulos de distintos tratamientos.

Tratamiento	*Recuperación de rizobios viables de nódulos (%)*
Testigo	41
Inoculado con D_{70}	42
Inoculado con N_4	43
Inoculado con N_{17}	23

Del análisis de los perfiles isoenzimáticos del total de los aislamientos se obtuvieron los porcentajes de ocupación nodular que se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Porcentaje de ocupación nodular de los distintos inoculantes.

Tratamiento	*Nódulos ocupados por la bacteria del inoculante (%)*
Inoculado con D_{70}	71
Inoculado con N_4	10
Inoculado con N_{17}	0

De acuerdo a estos resultados, puede verse que la cepa comercial D70 es mucho más competitiva frente a las poblaciones naturales del suelo que los aislamientos N_4 y N_{17}.

Los perfiles isoenzimáticos de los aislamientos obtenidos a partir de los nódulos de las plantas testigo no correspondían a ninguna de las cepas utilizadas como inoculantes, con lo cual se descarta cualquier indicio de contaminación y se asegura que las bacterias que nodularon espontáneamente dichas plantas provenían de las poblaciones naturales del suelo. Además, en el resto de los tratamientos, los perfiles isoenzimáticos que no correspondían a la cepa utilizada como inoculante, eran similares a aquellos de los aislamientos de los tratamientos testigo, es decir, respondían a un mismo ordenamiento de bandas (figura 14). La mayor parte de las poblaciones naturales del suelo, tenían dos bandas profusas en la zona inferior, algunas bandas de menor actividad en la zona intermedia del gel y por último, una serie de varias bandas continuas en la zona superior del mismo. Esto permite hacer aproximaciones acerca de la diversidad genética de las población de *R. leguminosarum* del suelo en cuestión, pudiendo afirmar que fueron recuperadas una gran diversidad de potenciales cepas de *R. leguminosarum*. Esto concuerda con

varios trabajos publicados sobre poblaciones naturales de rizobios de vicia (Ballard *et al.*, 2004; Palmer and Young, 2000). Además, aunque las poblaciones de rizobios mostraron patrones típicos de dominancia de cepas, la cepa dominante sólo fue recuperada en el 5% de los nódulos. Es necesario considerar que el grado de diversidad obtenido está influenciado por el poder de discriminación entre cepas que posee el método utilizado. La electroforesis de isoenzimas tiene un potencial menor al de los métodos de huellas digitales de PCR (Polymerase Chain Reaction). Se propone para futuros estudios de diversidad genética de la población de *R. leguminosarum*, el análisis de los aislamientos mediante otras metodologías, entre ellas, el de huellas digitales de rep-PCR (repetitive extragenic palindromic sequences – PCR) que ha sido demostrado que es más versátil que otros métodos de huellas digitales para el análisis de variación genética dentro de diferentes especies de rizobios (Niemman *et al.*, 1997). Por otra parte, la metodología "planta trampa" utilizada, es indirecta para determinaciones de diversidad genética y además podría limitar la población a aquellas cepas más competitivas y adaptadas, que nodulen exitosamente la planta huésped (Bromfield *et al.*, 1995).

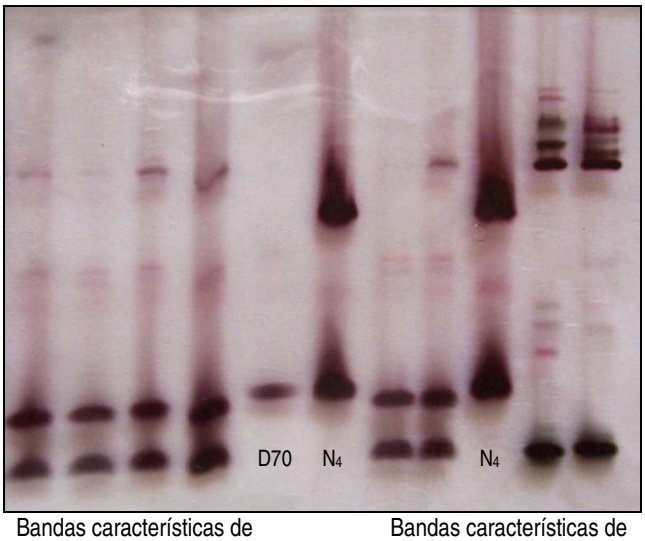


Figura 14. Perfiles de bandas de las bacterias utilizadas como inoculantes y de las poblaciones naturales del suelo.

Dado que la ocupación nodular de los tratamientos inoculados con el aislamiento N_{17} fue del 0%, se estudió si la cepa era incapaz de nodular, o bien, si era poco competitiva frente a las cepas nativas. Para ello se realizó la siguiente experiencia: se sembraron asépticamente cuatro semillas de vicia en 2 macetas con suelo estéril. Sobre una de ellas se practicó la inoculación con un cultivo abundantemente

crecido (24 h en agitador rotatorio a 28°C) de N_{17}, mientras que la otra maceta fue utilizada como control. Ambas se mantuvieron en invernáculo, en las mismas condiciones y fueron periódicamente regadas con agua estéril. Al cabo de 2 meses se observaron las raíces de las plantas de ambas macetas, verificándose ausencia de nodulación. Sin embargo, como puede observarse en la figura 15, las plantas del tratamiento testigo presentaron menor desarrollo que aquellas que habían sido inoculadas con N_{17}, lo cual estaría indicando que esta cepa tiene características PGPR, siendo necesario identificar su taxonomía y los mecanismos mediante los cuales ejerce su capacidad promotora del crecimiento.

Figura 15. Efecto de inoculación con N_{17} sobre el desarrollo de vicia sobre suelo estéril.

5. CONCLUSIONES

- ✓ La cepa comercial (D70) mostró mayor competitividad frente a las poblaciones naturales que los aislamientos nativos utilizados como inoculantes (N_4 y N_{17}), sin embargo, en base a la efectividad simbiótica de las poblaciones naturales, se concluye que el suelo utilizado cuenta con suficiente carga microbiana para nodular en forma eficiente la leguminosa estudiada.
- ✓ La bacteria SP aislada produce abundante solubilización de fosfatos en medio líquido, asimismo, a nivel de invernadero se observó una importante respuesta a la coinoculación con dicha bacteria; se recomienda por ello la inoculación del cultivo de vicia con bacterias solubilizadoras de fósforo.
- ✓ De acuerdo a los resultados de las electroforesis isoenzimáticas, puede concluirse además, que las poblaciones naturales son genéticamente diversas y disímiles de las cepas utilizadas como inoculantes.
- ✓ Con respecto al aislamiento N_{17}, se realizaron estudios posteriores, que demostraron que si bien se había aislado de un nódulo y presentaba características morfológicas propias de rizobios, no era capaz de nodular vicia, pero manifestaba capacidad PGPR.

6. BIBLIOGRAFÍA

AGUILAR, O.M.; LÓPEZ, M.V.; RICCILLO, P.M.; GONZALEZ, R.A.; PAGANO, M.; GRASSO, D.H.; PUHLER, A. AND FAVELUKES, G. (1998). Prevalence of the *Rhizobium etli*-like allele in genes coding for 16S rRNA among the indigenous rhizobial populations found associated with wild beans from the Southern Andes in Argentina. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 3520-3524.

AMIEVA, G.H. AND GUTIERREZ, A.J. (2001). Relevamiento de las especies del género *Vicia* cultivadas en la región de la Estepa Pampeana. Trabajo Final de Graduación. Facultad de Agronomía, UNLPam.

BALATTI, A.P. AND JARDIM FREIRE, J.R. (1996). Legume inoculants. Selection and characterization of strains. Production, use and management. Department of Chemistry, College of Exact and Natural Sciences, La Pampa University, Santa Rosa, La Pampa, Argentina; Department of soil Science, College of Agriculture, Porto Alegre, RS, Brasil.

BALLARD, R.A.; CHARMAN, N.; MC INNES, A.; DAVIDSON, J.A. (2004). Size, symbiotic effectiveness and genetic diversity of field pea rhizobia *(Rhizobium leguminosarum* bv*. viciae)* populations in South Australian soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 36: 1347-1355.

BERINGER, J.E.R. (1974). Factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol. 84: 188-198.

BLOEMBERG, G.V. AND LUGTENBERG, B.J.J. (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. Curr.Opin. *Plant Biology*. 4: 343-350.

BROMFIELD, E.S.P.; BARRAN L.R. AND WHEATCROFT, R. (1995). Relative genetic structure of a population of *Rhizobium meliloti* isolated directly from soil and from nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) and sweet clover (*Melilotus alba*). *Molecular Ecology.* 4: 183-188.

CASSAN, F. (2006). Protocolo para el aislamiento de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal de *Lotus* sp. En base a su capacidad in-vitro de fijar N atmosférico en vida libre, producir fitohormnas, sideróforos o solubilizar formas insolubles de fosfato. Curso Interacción Microorganismos-Plantas. IIB – INTECh. Cahscomús.

CHEMINING, G.N. AND VESSEY, K.J. (2006). The genetic diversity *of Rhizobium leguminosarum* bv*. Viciae* in cultivated soils of the eastern Canadian praire. *Soil Biology and Biochemistry*. 38: 153-163.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) (1988). Simbiosis leguminosa-rizobio; manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico. Ed. Rev. Proyecto CIAT-UNDP de evaluación selección y manejo de la simbiosis leguminosa rizobio para aumentar la fijación de nitrógeno. Sección de Microbiología de Suelos del Programa de Frijol (comp.). Cali, Colombia.

CONTI, M. (2000). "Principios de Edafología con énfasis en suelos argentinos." 2° Edición. Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.

DEMEZAS, D.H. AND BOTTOMLEY, P.J. (1987). Influence of soil and nonsoil environments on nodulation by *Rhizobium trifolii*, *Applied and Environmental Microbiology*. 53: 596-597.

DI RIENZO, J.; GUZMÁN, W.; AND CASANOVES, F. (2001). D.G.C., Test de Comparación de Medias. InfoStat Versión 1.1/Profesional. Grupo InfoStat. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

DOWDLE S.F. AND BOHLOOL, B.B. (1985). Predominance of fast growing *Rhizobium japonicum* in a soybean field in the People's Republic of China, *Applied and Environmental Microbiology*. 50 1171-1176.

DUODU, S.; NSIAH, E.K.; BHUVANESWARI, T.V.; SVENNING, M.M. (2006). Genetic diversity of a natural population of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* analysed from field nodules and by a plant infection technique. Short communication. *Soil Biology and Biochemistry.* 38: 1162-1165.

FARMER, JOHN. (s/f). Vicia villosa Roth. Grassland species profiles. FAO. Página de internet: http://www.fao.org/ag/Agp/agpc/doc/Gbase/DATA/Pf000506.HTM.

IGUAL, J.M.; VALVERDE, A.; CERVANTES, E. AND VELAZQUEZ, E. (2001). Phosphate – solubilizing bacteria as inoculant for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomie.* 21: 561-568.

KING, E.O.; WARD, M.K. AND RANEY. D.E. (1954). "Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin". *J. Lab. Clin. Med.* 44 (2): 301-307.

LEMOS, E.G.M. (1994). Classificacao e identificacao de bradirrizobios que nodulam soja por análise de padroes isoenzimáticos, serologia, morfología de colonias e atividades de hidrogense. Jaboticabal: Faculdade de Ciencias Agrarias e Veterinarias, UNESP. Tese de Livre-docencia. 108 p.

LODEIRO, A.R.; LÓPEZ GARCÍA, S.L.; MONGIARDINI, E.; QUELAS, J.I. AND PERTICARI, A. (2003). Los rizobios y la inoculación de las leguminosas para la fijación simbiótica de Nitrógeno. Microbiología Agrícola. Un aporte de la investigación Argentina. Ed. Albanesi, A.; Anriquez, A.; Luna, S.; Kunst, C. y Ledesma, R. Universidad Nacional de Santiago del Estero. Capítulo 14, 275 p.

LÓPEZ GARCÍA, S.L.; PERTICARI, A.; BAIGORRI, H.; FAVELUKES, G. AND LODEIRO, A.R. (2003). Mejora en la competitividad para la nodulación de soja mediante la inoculación de *Bradyrhizobium japonicum* en la línea de siembra. IV Reunión Nacional Científico-Técnica de Biología de Suelo. IV Encuentro Nacional sobre Fijación Biológica de Nitrógeno. Las Termas de Río Hondo, Santiago del Estero. 2-4.

MADSEN, E.L. AND ALEXANDER, M. (1982). Transport of *Rhizobium* and *Pseudomonas* through soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46: 57-560.

MARTÍNEZ, O. (2007). Comunicación personal. Cátedra de Botánica. Facultad de Agronomía, UNLPam.

MCDERMOTT, T.R. AND GRAM., P.H. (1989). *Bradyrhizobium japonicum* inoculant mobility, nodule occupancy, and acetylene reduction in the soybean root system. *Applied and Environmental Microbiology*. 55: 2493-2498.

MILLER, D.A. AND HOVELAND, C.S. (1995). Other temperate legumes. Barnes, R.F., Miller, D.A. and Nelson, C.J. (eds) Forages, An Introduction to Grassland Agriculture. Lowa State University Press, Ames, Lowa, 5th edn, Vol. 1: 273-281.

MOAWAD, H.A.; ELLIS, W.R. AND SCHMIDT, E.L. (1984).Rhizosphere response as a factor in competition among three serogroups of indigenous *Rhizobium japonicum* for nodulation of field grown soybeans, *Applied and Environmental Microbiology.* 47: 607-612.

MONTAÑEZ, A., LABANDERA, C.AND SOLARI, L. (2004). Fijación de nitrógeno a una escala nacional. LEIZA, Revista de Agroecología (Uruguay). 19-33.

NAUTIYAL, C.S. (2000). An efficient growth medium for screening phosphate solubilizing microorganism. *FEMS Microbiology Letters*. 170: 265-270.

NAUTIYAL, C.S.; BHADAURIA, S.; KUMAR, P.; LAL, H.; MONDAL, R. AND VERMA, D. (2000). Stress induced phosphate salubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiology Letters*. 182: 291-296.

NIEMANN, S.; PÜHLER, A.; TICHY, H.V.; SIMON, R. AND SELBITSCHKA, W. (1997). Evaluation of the resolving power of three DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. *Journal of Applied Microbiology.* 82: 477-484.

OLIVARES PASCUAL, J. (2004). Fijación biológica de Nitrógeno. Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, España.

PALMER, K.M. AND YOUNG, J.P.W. (2000). Higher diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations in arable soils than in grass soils. Applied and Environmental Microbiology. 6: 2445-2450.

PURICELLI, C.A. (1996). La consociación de avena más vicia en el S.O. de Buenos Aires, una revisión de antecedentes. SAGyP – INTA, Centro Regional Buenos Aires Sur, E.E.A. Bordenave. Bs. As. Argentina.

RODRÍGUEZ, H. AND GONZALES, T. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion, *Biotechnol. Adv*. 17: 319-339.

RODRÍGUEZ, J. (1993). Manual de Fertilización. Colección en Agricultura. Facultad Agronomía. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 362 pp.

ROMERO, N. (2002). Alfalfa: limitantes productivas en la región pampeana. INTA EEA Anguil. Boletín de Divulgación Técnica N° 73.

RUFFO, M.L. AND PARSONS, A.T. (2004). Cultivos de cobertura en sistemas agrícolas. Informaciones Agronómicas del Cono Sur, N° 21.

SADOWSKI, M.J. AND GRAHAM, P. (1998). Soil biology of the *Rhizobiaceae*. H.P. Spaink, A. Kondorosi y P.J.J. Hooykaas (eds.). The *Rhizobiaceae*. Molecular biology of model plant-associated bacteria. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 155-172

SATORRE, E.; BENECH ARNOLD, R.; SLAFER, G.; DE LA FUENTE, E.; MIRALLES, D.; OTEGUI, M. AND SAVIN, R. (2003). "Producción de Granos. Bases funcionales para su manejo." 1° Edición. Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.

SELANDER, R.K; CAUGANT, D.A.; OCHMAN, H.; MUSSER, J.M.; GILMOUR, M.N. AND WHITTAM, T.S. (1986). Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Applied and Environmental Microbiology*. 51: 873-884.

SIDDIQUE, K.H.M. AND LOSS, S.P. (1996). Growth and seed yields of vetchs (vicia ssp) in south-western Australia. Aust. J. Exp. Arg.

THIES, J.E.; SINGLETON, P.W. AND BOHLOOL, B.B. (1991). Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. *Applied and Environmental Microbiology*. 57: 19-28.

THOMPSON, J.A. AND VINCENT, J.M. (1967). Methods of detection and estimation of rhizobia in soil. *Plant and Soil.* 1: 72-84.

TWORNLOW, S. (2004). Increasing the role of legumes in smallholder farming systems. The future challenge. Rachid Serraj (ed.) Simbiotic Nitrogen Fixation. Sci. Publ. Inc. USA. 382 pp.

UNDERSANDER, D.J.; EHLKE, N.J; KAMINSKI, A.R.; DOLL, D.J. AND KELLING, K.A. (1990). Hairy Vetch. Alternative Field Crops Manual. Departments of Agronomy and Soil Science, College of Agricultural and Life Sciences and Cooperative Extension Service, University of Wisconsin-Madison, WI 53706. Department of Agronomy and Plant Genetics, University of Minnesota, St. Paul, MN 55108.

URZÚA, H. (2000). Fijación Simbiótica de Nitrógeno en Chile: Importante herramienta para una agricultura sustentable. Publ. XX Reunión Latinoamericana de Rhizobiología (IDEMA/U.S.Agustín). Arequipa, Perú. 221-228.

URZÚA, H.; URZÚA, J.M. AND PIZARRO, R. (2001). Pre-selección de cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* en vicia forrajera, para abonos verdes. *Ciencia e Investigación Agraria*. 28 (1): 3-6.

VESSEY, K.J. AND CHEMINING'WA, G.N. (2006). The genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* in cultivated soils of the eastern Canadian prairie. *Soil Biology and Biochemistry*. 38: 153-163.

VINCENT, J.M. (1970). A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

WATANABE, I. (2000). Biological nitrogen fixation and its use in Agriculture (outline). www.osahinet.or./~it6i-wtnb/BNF.html. J.ICA/Cantho Univ.Expert. Mar – Apr. Vietnam.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de La Pampa, y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, donde comencé y finalicé mis estudios.

A toda la gente del Departamento de Química, personal docente y no docente, con quienes compartí tanto tiempo durante la carrera, especialmente durante el trabajo de tesis, por su predisposición permanente e incondicional.

A la Dra Ana Lía Ronchi y la Dra Alicia Grassano, quienes con su experiencia me formaron en el campo de la investigación, brindándome todo su tiempo y dedicación, por ser mi guía en este trabajo, por su asesoramiento, su confianza y su afecto.

Al Ing. Oscar Martínez, por su colaboración en la identificación de las semillas y plantas de vicia.

A la Lic. Valeria Belmonte, por su asesoramiento en la realización del análisis estadístico de los resultados.

A “las chicas” Pau, Lau, Nanci, Ana, Lili, Jor, por ser mis amigas, estar siempre y acompañarme todos estos años, compartiendo cada momento de la vida universitaria.

A mis amigos, simplemente por su amistad, que es más que importante.

A Juan, por alentarme, acompañarme y comprenderme siempre.

A mi familia, que confió en mí y me dio todo, dejándome el legado más importante que pudiera recibir, mis estudios universitarios, por lo cual estaré eternamente agradecida.

A todos aquellos que de alguna u otra forma colaboraron en la realización de la tesis.