UNIVERSIDAD NACIONAL
de LA PAMPA

FACULTAD DE CIENCIAS
EXACTAS Y NATURALES

ESPECIFICIDAD DE LA ASOCIACIÓN SIMBIÓTICA DE *MEDICAGO SATIVA* Y *SINORHIZOBIUM MELILOTI* FRENTE A FACTORES CONDICIONANTES

Trabajo de tesis para acceder al grado de

Licenciado en Química

Amalia Anahí Beltramo

Directora: Dra. Ana Lía Ronchi

2007

Mi agradecimiento:

- Al Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNLPam, donde curse mis estudios y lleve a cabo este trabajo de tesina.

- A la Dra. Ana Lía Ronchi, por acompañarme y guiarme en todo momento.

- A la Dra. Alicia Grassano, Dra. Mónica Bellozas y la Lic. Patricia García por estar siempre dispuestas a ayudarme.

- A mi mamá y mi papá, que me dieron la posibilidad de estudiar y siempre me alentaron y apoyaron en mis decisiones.

- A mis hermanos que siempre estuvieron cuando los necesite.

- A Cristián por acompañarme todo este tiempo.

- A mis amigas por estar a mi lado en todo momento.

- Y a todos aquellos que directa o indirectamente colaboraron en este proyecto.

ÍNDICE

Introducción ……... **1**
Agricultura Sustentable 2
Rol del Nitrógeno 5
Las Leguminosas 6
La Alfalfa 7
Microorganismos PGPR 12
Rizobios 13
Interacciones Planta-Microorganismo 16
Nodulación 16
Fijación de Nitrógeno 25
Competición para la nodulación 32

Objetivo …… **33**

Materiales y Métodos ……. **35**
Semillas 36
Microorganismos 36
Medios de cultivo 38
Desarrollo de las cepas de *S. meliloti* 38
Medidas de concentración celular 39
Control de pureza de los caldos fermentados 39
Electroforesis de isoenzimas 39
Ensayo Agronómico en cámara 43

Resultados y Discusión …….. **47**
Caracterización de cepas de *S. meliloti* 48
Estudio del crecimiento celular de cepas de *S. meliloti* en medios de cultivo líquido 48
Electroforesis de isoenzimas 49
Interacciones Planta-Microorganismo 52
Ensayo en cámara climatizada - Determinaciones cualitativas 52
Determinación del peso seco de parte aérea y raíz 57
Determinación del I. E. R. 61
Determinación del contenido de nitrógeno 62

Conclusiones ……... **64**

Bibliografía ……. **66**

Introducción

En todos los países especialmente en los más industrializados, existe cada vez más preocupación por la degradación del medio natural y es tema debatido en los foros internacionales, que en los últimos años llevan celebrando una serie de reuniones e iniciativas a los más altos niveles científicos y políticos para discutir los principales problemas ambientales a escala mundial que afectan al medio atmosférico, acuático y terrestre.

Tradicionalmente los agricultores han vivido y trabajado en armonía con la naturaleza, manteniendo sus tierras con abonos orgánicos y protegiéndolas con técnicas naturales. Pero en los últimos 50 años la agricultura ha sufrido una revolución tecnológica que ha desembocado en una mecanización generalizada, en el uso creciente de fertilizantes y agroquímicos para conseguir un aumento de la productividad agrícola, convirtiéndose en una "agricultura intensiva", provocando la existencia de excedentes y problemas de contaminación por el uso abusivo de fertilizantes y pesticidas. Se han sustituido las labores que antes hacían los animales por máquinas cuyo uso acelera los procesos erosivos y degradación de los suelos. Esta intensificación ha producido mayores rendimientos de los cultivos, pero ha repercutido negativamente sobre los ecosistemas agrarios, contribuyendo también al desequilibrio energético (combustibles fósiles) y ambiental. La contaminación se ha extendido no sólo al suelo sino a las aguas subterráneas y de ahí a las aguas superficiales.

Sin embargo, el mantenimiento de cierta actividad agrícola es un requisito esencial no solo para la producción de alimentos sino para proteger el equilibrio ecológico, especialmente en zonas desfavorecidas y para evitar incendios forestales, terrenos baldíos, terrenos inundados, etc. Es por ello que se esta tratando de incorporar un nuevo sistema de agricultura, una agricultura sustentable con capacidad de mantenerse o prolongarse en la agricultura del futuro (de Felipe Antón, M. A., pág. web).

AGRICULTURA SUSTENTABLE

Los ecosistemas dejan de ser sustentables cuando el hombre comienza a explotarlos abriendo sus ciclos minerales (Aragón, J. R. et al., 1995). En condiciones ideales, el sistema natural (Figura 1) se auto preserva reciclando su propia materia a través del ciclo biológico de las especies de plantas y animales que lo componen. La fuga de nutrientes es mínima y está compensada por ganancias que ocurren desde el entorno. En el sistema agropecuario (Figura 1), en cambio, el ciclo está abierto y se produce, por extracción de productos animales y vegetales, una fuga muy considerable de nutrientes. A veces esos nutrientes son compensados parcialmente por una incorporación mineral artificial (fertilizantes) o natural, como ocurre en

el caso del nitrógeno (nutriente muy importante para las plantas) por la fijación biológica; pero otras veces el proceso es directamente extractivo y el sistema entra decididamente en pérdida. Es muy frecuente que la necesidad de generar un balance económico positivo en el corto plazo, dirigido a incrementar la producción, encuentre su contraparte en la producción de un balance ecológico francamente negativo en el mediano o largo plazo (Aragón, J. R. et al., 1995).

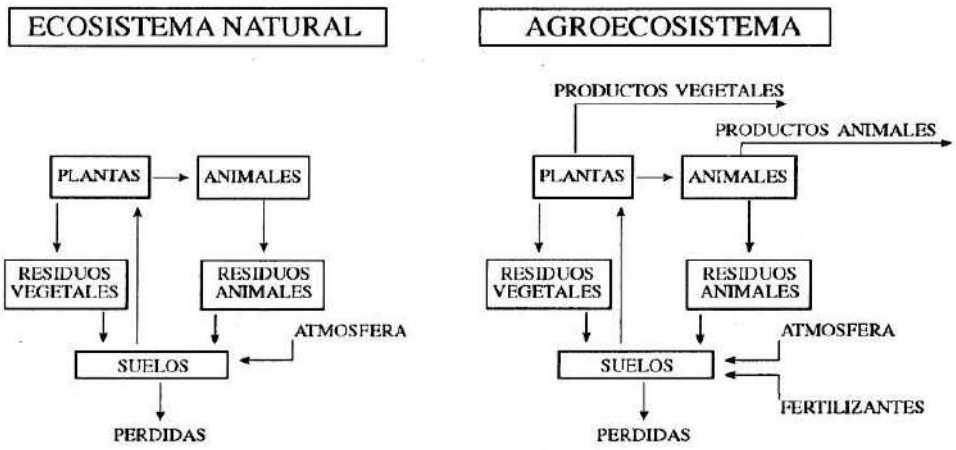


Figura 1: Flujo de nutrientes en ecosistemas naturales y agroecosistemas (King, L. D. 1992).

La utilización de fertilizantes nitrogenados en la agricultura ha causado daños ambientales, entre los cuales cabe destacar la eutrofización de la desembocadura de cursos de agua que recogen excesos de nitrato 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 indispensable manejar al nitrógeno como recurso natural no sólo desde el punto de vista de su obtención sino también atendiendo al manejo de su circulación y destino. En este aspecto, la fijación biológica de nitrógeno contribuye a disminuir la necesidad de aplicación de fertilizantes químicos y a mantener la estructura y la materia orgánica de los suelos, siendo una alternativa económica y ecológicamente limpia (Phillips, D. A. et al., 1997; Azcón – Bieto F. and Talón M., 2000).

En este proceso de conversión hacia modelos más sustentables, las leguminosas aparecen en el centro de la escena como uno de los engranajes clave que moviliza y regula el movimiento del sistema (Aragón, J. R. et al., 1995).

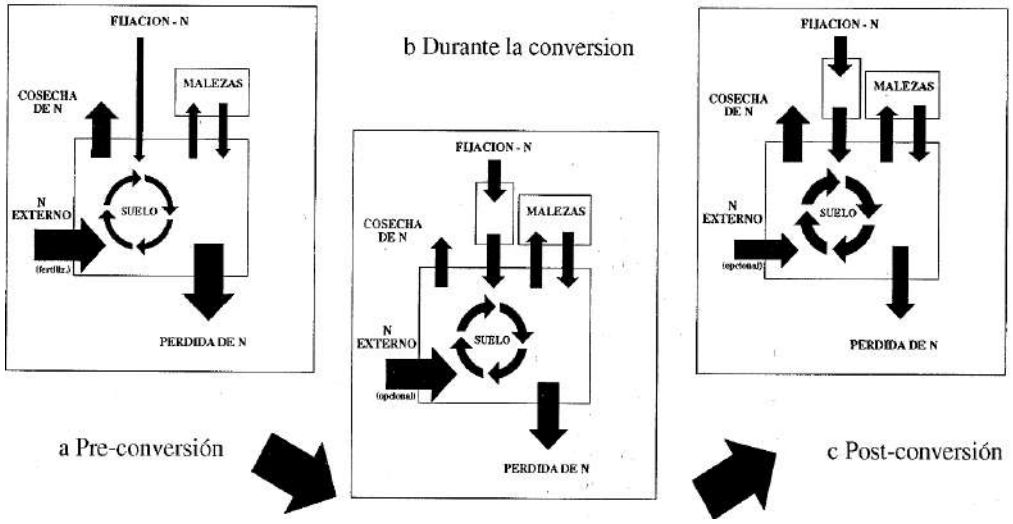


Figura 2: Dinámica del ciclo del nitrógeno esperable durante el proceso de transformación de la agricultura convencional en orgánica (Andrews, R. W. et al., 1992).

Puede observarse que en este proceso de conversión en una agricultura sustentable (Figura 2) se recorren tres etapas distintas entre sí:

Primero, nos encontramos en una etapa de preconversión, en la cual tenemos un sistema convencional de cultivo continuo, de altos insumos, con fuerte incorporación de nitrógeno sintético y una elevada extracción de nitrógeno que se fuga con el producto cosechado. Como la cantidad de nitrógeno que se incorpora a los componentes biológicos del sistema es muy baja, una parte considerable del mismo, al no quedar retenido en el complejo suelo-planta, se pierde para el sistema. Consecuentemente, el ciclo del nitrógeno en este tipo de agricultura es muy abierto, poco vigoroso y de escasa relevancia (Andrews, R. W. et al., 1992; Koepf, H. H. et al., 1976; Patriquin, D. G., 1986; Radke, J. K. et al., 1988). En el intento de mantener la fertilidad de los suelos, se realiza el aporte de nitrógeno mediante el uso de fertilizantes químicos (Ronchi, A. L., 1994). Estos, favorecen el aumento del rendimiento de los cultivos, pero su uso continuo provoca problemas de contaminación (Racca, R., 2003).

Durante la segunda etapa, que ocurre durante el proceso de conversión, nos encontramos con un sistema que, más allá de una aplicación opcional de fertilizantes y otros agroquímicos, incorpora pasturas a base de leguminosas en rotación con cultivos y heno para el ganado. En este sistema se vigoriza notablemente la cantidad de nitrógeno que ingresa por vía biológica, la que es retenida por el complejo suelo-planta y cicla a través de los componentes biológicos del sistema. Al haber más nitrógeno retenido en las fracciones orgánicas, tanto la cosecha

como las pérdidas se reducen considerablemente (Aragón, J. R. et al., 1995). Se observa un "incentivo" para el desarrollo de fuentes alternativas para la fijación de nitrógeno, incluyendo el desarrollo de microorganismos como "fertilizantes bacterianos", es decir, aumentando la FBN mediante el empleo de inoculantes (Racca, R., 2003; Ronchi, A. L., 1994).

En la tercera etapa, culminado el proceso de transformación, se encuentra un sistema enriquecido en su base nitrogenada, marcadamente vigoroso en su ciclo mineral, menos dependiente de insumos externos, con pérdidas de nitrógeno muy reducidas y un aumento en la productividad potencial (Andrews, R. W. et al., 1992; Koepf, H. H. et al., 1976; Patriquin, D. G., 1986; Radke, J. K et al., 1988).

Rol del Nitrógeno

Como puede verse en esta búsqueda de una agricultura sustentable el nitrógeno recibe particular atención. El mismo, es uno de los elementos más abundantes en la naturaleza, encontrándose distribuido en tres principales reservorios: el atmosférico, donde representa alrededor del 78%; el suelo, en donde se encuentra en cantidades variables y el nitrógeno contenido en la biomasa que varía entre el 8% y 10%. Las complejas relaciones de intercambio entre estos tres reservorios se conocen como ciclo del nitrógeno. El nitrógeno presente en la atmósfera, es relativamente inerte, pero puede reaccionar con otros compuestos y convertirse en compuestos asimilables por las plantas y por otros organismos (Azcón – Bieto F. and Talón M., 2000; Bedmar, E. J. et al., 1992). Este elemento es muy importante para las plantas ya que tan solo el carbono, el hidrógeno y el oxígeno son más abundantes que él como constituyentes de los tejidos vegetales; forma parte de numerosas biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, porfirinas y alcaloides. Puede ser obtenido por las plantas por absorción del suelo en forma de nitrato o amonio, o bien por reducción del nitrógeno atmosférico estableciendo asociaciones simbióticas con diversas bacterias.

Las simbiosis fijadoras de nitrógeno más conocidas e importantes desde una perspectiva económica son las que se establecen entre las raíces de leguminosas y las bacterias de la familia *Rhizobaceae* (Azcón – Bieto F. and Talón M., 2000).

En muchos de nuestros suelos existen naturalmente cepas nativas o naturalizadas de rizobios, pero a menudo, fallan en producir una simbiosis efectiva debido al escaso número o a la ausencia de especificidad con la leguminosa a implantar. Por lo tanto, el aprovechamiento de esta asociación simbiótica requiere la inoculación de la leguminosa con una concentración adecuada del rizobio correspondiente, la cual va a ser esencial para una nodulación efectiva;

aunque también hay que tener en cuenta que tanto factores bióticos como abióticos pueden afectar la misma (González, F., pág. web). Dentro de la agricultura sustentable esta asociación simbiótica tiene un enorme impacto como método de biofertilización capaz de mantener un balance adecuado entre las fuentes y destinos del nitrógeno, compatible con altos niveles de producción de grano y forraje, esto ocurre, siempre y cuando, la fijación de nitrógeno lleve a cabo el establecimiento de un sistema de nódulos activos capaz de asimilar y traslocar la suficiente cantidad de nitrógeno a la planta como para que ésta no extraiga grandes cantidades de nitrógeno del suelo (Azcón – Bieto F. and Talón M., 2000; Lodeiro, A. R. et al., 2003).

LAS LEGUMINOSAS

Las leguminosas constituyen una familia de origen tropical arborescentes que debido a que desde su origen en el Cretáceo superior, en condiciones tropicales húmedas, se han ido extendiendo a otras condiciones climáticas sus más recientes derivados son pequeñas matas o hierbas de las regiones templadas. Representan la tercera familia de plantas de flor, superadas por las *Compositae* y las *Orchidacea* (Frioni, L., 1999).

La extensa familia de las *Leguminosae* tiene una enorme diversidad, cuenta con más de 18.000 especies en 650 géneros, clasificados en tres subfamilias: *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae*, y *Papilionoideae* (Polhill, R. M. and Raven, P. H., 1981). Incluídas en éstas se encuentran la soja, la alfalfa, el trébol y las que producen las arvejas y porotos. Gracias a la amplia diversidad en sus hábitos de crecimiento (fisonomía) y su adaptación ambiental, las leguminosas ocupan nichos y hábitat muy distintos y constituyen una parte importante de la vegetación en una amplia variedad de sabanas tropicales (Giller, J. E. et al., 1994).

Son utilizadas en distintas formas en la agricultura y la silvicultura: como alimentación, forraje, leña y fertilizante (Giller, J. E. et al., 1994). Un aspecto común de todas las leguminosas, independientemente de si son capaces de fijar nitrógeno o no, es la alta concentración del mismo en sus tejidos (McKey, D., 1994). Por lo cual su principal uso, como fuente importante de proteínas para humanos y animales, depende de la adquisición de nitrógeno y de su acumulación en altas concentraciones en el follaje y en las semillas (Giller, J. E. et al., 1994).

Se ha examinado la capacidad para nodular de 3395 especies, lo que supone cerca de un 57% de los géneros de leguminosas. El porcentaje de especies susceptibles de ser noduladas varía mucho en las diversas subfamilias de leguminosas: 25% en *Caesalpinioideae*, 90% en *Mimosoideae* y 97% en *Papilionoideae* (Azcón – Bieto F. and Talón M., 2000).

La capacidad de fijar nitrógeno atmosférico se relaciona directamente con el nitrógeno presente en el tejido vegetal, dado que existen evidencias de que en las *Caesalpinioideae*, en media, las concentraciones de nitrógeno son ligeramente más bajas que en las otras dos subfamilias (Waterman, P. J., 1994). Por esta razón puede concluirse también que leguminosas no noduladoras que muestran altas tasas de crecimiento, son competidores agresivos por el nitrógeno del suelo para satisfacer sus demandas; y que dentro del ciclo de nitrógeno en ecosistemas naturales y agrícolas, las leguminosas fijadoras de nitrógeno son importantes proveedoras del mismo (Giller, K. E. and Vargas, E., 1996).

En el caso de la alfalfa, la misma puede obtener el nitrógeno que necesita estableciendo una relación simbiótica con el rizobio *Sinorhizobium meliloti* con la consecuente formación de nódulos de crecimiento apical o indeterminados de aspecto alargado (Lodeiro, A. R. et al., 2003).

La Alfalfa

La alfalfa (*Medicago sativa*) según estudios efectuados tuvo dos centros de origen no relacionados entre sí. Uno de ellos está situado en las áreas montañosas de Transcaucasia y en las áreas adyacentes del noroeste de Irán; el segundo se ubica en Asia Central, en el Turquestán y zonas vecinas de Rusia. En el nuevo mundo la alfalfa fue introducida por los conquistadores españoles; en el año 1519 se la llevó a México y posteriormente, en el s. XVII, por la ruta del Pacífico, fue transportada a Perú y Chile y por vía terrestre a Argentina, iniciándose su cultivo en las provincias cuyanas, sin embargo, la difusión explosiva en nuestro país no aconteció hasta fines del s. XIX y principios de s. XX (Bolton, J. L. et al., 1972; Aragón, J. R. et al., 1986).

En cuanto a su botánica, se trata de una planta perenne, vivaz y de porte erecto. La raíz principal es pivotante, robusta y muy desarrollada, con numerosas raíces secundarias. Posee una corona que sale del terreno, de la cual emergen brotes que dan lugar a los tallos. Los mismos son delgados y erectos para soportar el peso de las hojas y de las inflorescencias, además son muy consistentes, por tanto es una planta muy adecuada para la siega. Las hojas son trifoliadas, aunque las primeras hojas verdaderas son unifoliadas (Figura 3), los márgenes son lisos y con los bordes superiores ligeramente dentados.

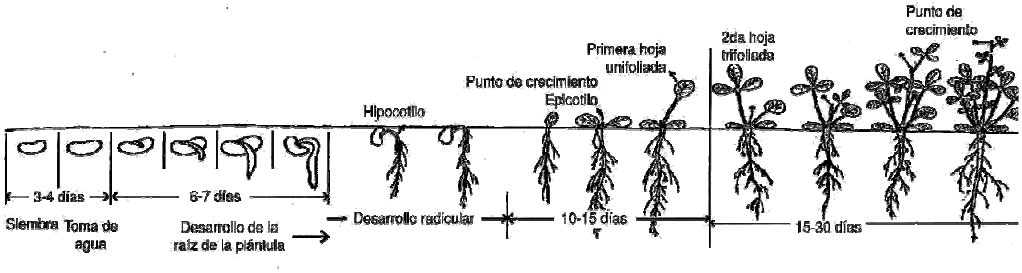


Figura 3: Ciclo vegetativo de la alfalfa donde se ve ilustrado la emergencia de la primer hoja unifoliada y posteriormente la emergencia de hojas trifoliadas (Aragón, J. R. et al., 1995).

La flor característica de la subfamilia *Papilionoidea*, *e*s de color azul o púrpura, con inflorescencias en racimos que nacen en las axilas de las hojas (Figura 4).

Figura 4: Inflorescencias de *M. sativa*.

Por último, su fruto, es una legumbre indehiscente sin espinas que contiene entre 2 y 6 semillas amarillentas, arriñonadas de 1.5 a 2.5 mm de longitud (Infoagro, pág. web).

Ecotipos

Debido a que la alfalfa fue acompañando al hombre en sus migraciones por los climas templados del mundo, se fue adaptando con éxito a nuevas condiciones ambientales; lo que ha posibilitado, a través de la selección natural, la creación de ecotipos. El grado de reposo invernal y la resistencia a plagas y enfermedades son factores determinantes de esa adaptación (Aragón, J. R. et al., 1986; Aragón, J. R. et al., 1995).

En Argentina de acuerdo al origen se diferencian tres tipos de ecotipos:

Ecotipo pampeano: la alfalfa común sembrada en la llanura pampeana tuvo desde la época de difusión del cultivo un sistema predominante de utilización, el pastoreo con animales. Este sistema ha generado a través de los años un ecotipo regional apto para esa forma de uso. El ecotipo pampeano proveniente de la región pampeana bonaerense, es de baja tasa de crecimiento otoño-invernal, con plantas de coronas amplias, bien desarrolladas, tallos foliosos

desde la base con folíolos pequeños, porte semirrecto y reposo invernal medio (Aragón, J. R. et al., 1986).

Ecotipo cordobés: originario del centro de la provincia de Córdoba. Posee un crecimiento invernal intermedio, con mayor tasa de crecimiento que el anterior. Presenta coronas menos desarrolladas y un hábito semi-erecto. Tiene excelente capacidad de producción de semillas (Aragón, J. R. et al., 1986).

Alfalfas invernizas: son originarias de las regiones de riego, con menor reposo invernal y frecuentemente utilizadas para corte. Las coronas son de tamaño pequeño y su hábito de crecimiento es erecto (Aragón, J. R. et al., 1995).

Requerimientos edafoclimáticos

La radiación solar es un factor muy importante que influye positivamente en el cultivo de la alfalfa, pues el número de horas de radiación solar aumenta a medida que disminuye la latitud de la región. La radiación solar favorece la técnica del presecado en campo en las regiones más cercanas al ecuador y dificulta el secado en las regiones más alejadas (Infoagro, pág. web).

Otro factor importante es la temperatura, la semilla germina a temperaturas de 2-3ºC siempre que las demás condiciones ambientales lo permitan; a medida que se incrementa la temperatura la germinación es más rápida hasta alcanzar un óptimo a los 28-30ºC. Temperaturas superiores a 38ºC resultan letales para las plántulas. Las bajas temperaturas también afectan las plantas, las cuales al comenzar el invierno, detienen su crecimiento hasta la llegada de la primavera cuando comienzan a rebrotar, aunque existen variedades de alfalfa que toleran temperaturas muy bajas (-10ºC) (Infoagro, pág. web).

Con respecto al pH del suelo la planta es neutrófila (Woodruff, C. M., 1967). El factor limitante en el cultivo de la alfalfa es la acidez, excepto en la germinación, pudiendo ser de hasta 4. El pH óptimo del cultivo es de 7.2, recurriendo a encalados siempre que el pH baje de 6.8 (Infoagro, pág. web).

Otro factor a considerar es la salinidad, la alfalfa es muy sensible a ésta, pues si bien tolera suelos de hasta 8 mmho/cm, esto lo hace a costa de una reducción del 50% de la productividad (Infoagro, pág. web; Aragón, J. R. et al., 1986).

En cuanto al tipo de suelo, requiere suelos profundos y bien drenados, aunque se cultiva en una amplia variabilidad de suelos. Los suelos con menos de 60 cm de profundidad no son aconsejables para la alfalfa, debido a que pierde su ventaja comparativa sobre las otras forrajeras de enraizamiento más superficial cuando las condiciones del suelo restringen su

desarrollo radical (Aragón, J. R. et al., 1986; Infoagro, pág web).

Con respecto a los requerimientos hídricos, es morfológica y fisiológicamente apta para resistir a las sequías, pero no es resistente al anegamiento. Esta tolerancia es intrínseca y a ella se suma el efecto benéfico del profundo sistema radical que, en caso de necesidad, permite a la planta explorar para sus requerimientos hídricos capas profundas del subsuelo (Kiesselbach, T. A. et al., 1929). La sensibilidad al anegamiento se da sobre todo en aguas estancadas y es debido a la falta de oxigenación a nivel radicular. La magnitud de los daños que puede sufrir debido a esta causa depende tanto del estado fisiológico de la planta como de la temperatura (Aragón, J. R. et al., 1986).

Requerimientos Nutricionales

Para sus requerimientos nutricionales, la alfalfa depende principalmente de la parte superficial del suelo, pues allí se localiza la mayor parte de la actividad absorbente del aparato radical (Aragón, J. R. et al., 1986).

Bajo cualquier sistema de aprovechamiento hay una demanda continua de nutrientes durante todo el ciclo de producción (Culot, J. P., 1986). Esta demanda no es idéntica para todas las variedades. En términos generales, la intensidad de la misma se corresponde con el ritmo de crecimiento, pero es mayor al iniciarse el rebrote, mostrando los tejidos jóvenes una mayor concentración de nutrientes (Smith, D., 1969).

En cuanto a los requerimientos de nitrógeno, para la planta, es más económico tomar nitrógeno del suelo que de la fijación biológica, a mayor presencia de mismo en el suelo menores posibilidades hay para la fijación biológica y a la inversa (Perticari, A., pág. web). En condiciones óptimas de cultivo; cuando el pH no es muy ácido y no existe déficit de ningún elemento esencial a no ser de nitrógeno en el suelo, la alfalfa obtiene el mismo por las bacterias de sus nódulos. Sin embargo, durante el estado vegetativo de las plántulas, el nitrógeno debe ser aportado por el suelo hasta que se formen los nódulos y comience la fijación (Infoagro, pág. web).

Por otro lado el aporte de fósforo es muy importante en el año de establecimiento del cultivo, pues asegura el desarrollo radicular; el de potasio es muy importante, la alfalfa requiere grandes cantidades de este elemento, pues de él depende la resistencia al frío, sequía y almacenamiento de reservas; también hay que tener en cuenta la carencia de boro ya que ocasiona la detención del crecimiento, amarillamiento de las hojas terminales y crecimiento entre nudos escaso, y la de molibdeno, que afecta al funcionamiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno (Infoagro, pág. web).

Importancia Económica

La ganadería intensiva es la que ha demandado de forma regular los alimentos que ha tenido que proveer la industria, dando lugar al cultivo de la alfalfa, cuya finalidad es abastecer a la industria de piensos (Infoagro, pág. web).

En la Argentina, la alfalfa ha demostrado ser una forrajera excelente para la alimentación del ganado. Sin embargo, la dimensión real de su valor surge cuando se considera, además, de su forraje nutritivo, su efecto complementario en la rotación de cultivos proporcionando fertilidad a los suelos. Tiene un valor económico adicional proporcionando estabilidad al sistema al controlar la erosión (sosteniendo la estructura física) y ciertas plagas y mantener una relativa buena producción bajo condiciones de sequía. Cada uno de estos factores proporciona un balance positivo que favorecen a este cultivo en la economía agropecuaria (Aragón, J. R. et al., 1986).

El valor nutritivo de la alfalfa radica en su alto potencial de producción de materia seca, alta concentración de proteínas, alta digestibilidad y un elevado potencial de consumo animal. A esto debe sumarse su alto contenido de vitaminas A, E, y K o sus precursores y de la mayoría de los minerales requeridos por el ganado productor de leche y carne, en especial, calcio, magnesio, potasio y fósforo (Berger, M. E. et al., 1985; Conrad, H. R. and Martz, F. A., 1985; Berger, M. E. et al., 1986).

Con respecto a la fertilización del suelo, en el país, se ha registrado acumulación de nitrógeno de hasta 1000 kg/ha en los primeros 30cm de suelo como consecuencia de cultivar 5 años alfalfa y un incremento del 0,5% en el contenido de materia orgánica luego de tres años de cultivo (Bonel, J. A. et al., 1979; Aragón, J. R. et al., 1986). La parte principal del nitrógeno en el suelo está contenida en la materia orgánica y por ello es importante el papel de la alfalfa en la mayor acumulación de la misma, además del efecto beneficioso que tiene su aporte en la estructura del suelo.

La alfalfa en la rotación de cultivos cumple con la función de mantener el contenido de materia orgánica y el nivel de nitrógeno del suelo (Lyon, T. L. and Buckman, H. O., 1952). Tanto las experiencias locales como las extranjeras demuestran que el efecto combinado del aporte de materia orgánica, nitrógeno y mejor estructura que se obtiene en el suelo beneficia por varios años a los cultivos que integran la rotación (Hoyt, P. B. and Henning, A. M. F., 1971; Tucker, B. B. et al., 1971; Spratt, E. D. et al., 1972; Parodi, L. R., 1974; Otamendi, H. and Ossana, J. E., 1978). A su vez, las características de las raíces de la alfalfa le permiten a la planta explorar ampliamente el perfil del suelo en la búsqueda de agua y acceder a nutrientes en profundidad, ello confiere a la alfalfa un rol adicional en el sistema de producción:

importar nutrientes hacia la superficie e integrarlos a los procesos biológicos que allí se desarrollan (Aragón, J. R. et al., 1995).

MICROORGANISMOS PGPR

Los microorganismos interactúan con las plantas a nivel del follaje, en la superficie del suelo, alrededor de las raíces y semillas. Los microorganismos encuentran allí abundantes materiales carbonados y un ambiente particular con condiciones físico-químicas diferentes que las del suelo sin cultivar. Las plantas, por su parte, reciben numerosos metabolitos, muchos de ellos promotores de crecimiento, de la micropoblación edáfica (Frioni, L., 1999).

El área clave de interacciones entre microorganismos y plantas es la rizósfera (zona del suelo afectada por las raíces), donde se llevan a cabo la mayoría de las transformaciones metabólicas (Frioni, L., 1999). En la rizósfera, interactuando con los vegetales se encuentra un gran número de microorganismos tales como bacterias, hongos, actinomicetes, algas y protozoos; de éstos las bacterias son las más abundantes (Paul, E. A. and Clark, F. E., 1989; Basham, Y. and Levanony, H., 1990; Lynch, J. M., 1990). Estas bacterias se denominan rizobacterias, las mismas pueden tener efectos deletéreos, neutros o beneficiosos sobre la planta; en este último caso, algunas pueden establecer una relación simbiótica y otras ejercer su acción benéfica sin asociación (vida libre), mediante la liberación de distintos tipos de metabolitos que actúan promoviendo el desarrollo vegetal (PGPR) (Kloepper J. W., 1996).

La acción PGPR se manifiesta por mecanismos que se clasifican en directos, cuando la bacteria produce metabolitos que directamente promueven el crecimiento sin interactuar con la microflora nativa, tales como fijación de nitrógeno atmosférico, síntesis de sideróforos, síntesis de diferentes fitohormonas, mecanismos para movilizar y solubilizar minerales tales como fósforo o azufre y disponerlos para el crecimiento vegetal; e indirectos, cuando a través de los mismos se produce la reducción o el control de organismos deletéreos como puede ser por la producción de cianidas, de antibióticos y la inducción de resistencia sistémica contra patógenos (Chabot, R. et al., 1996; Antoun, H. et al., 1998; Nieto, K. and Frakerberger, W., 1989; Keel, C. et al., 1992).

Numerosas publicaciones advierten sobre efectos rizosféricos positivos. En general, se admite que son las bacterias no esporuladas, Gram-negativas las que producen estos efectos. Dentro de las cuales podemos encontrar las bacterias fijadoras de nitrógeno noduladoras de leguminosas denominadas colectivamente rizobios (Frioni, L., 1999).

Rizobios

Los rizobios tienen morfología normalmente bacilar y no son formadores de esporas. Son móviles por la presencia de un flagelo polar o subsolar, o de dos a seis flagelos perítricos. El aspecto de las colonias depende del medio de cultivo y de la especie, las colonias tienen un aspecto mucilaginoso debido a la presencia de polisacáridos extracelulares y su forma varía desde plana a convexa, su color puede ser blanco opaco poco gomosa, a blanco lechosa traslucida, según la cantidad de polisacáridos; a veces los cultivos envejecidos tienden a formar asociaciones estrelladas o rosetas en medio LMA (Extracto de levadura-manitol agarizado). Son aerobios, sin embargo, son capaces de crecer a una tensión de oxígeno menor de 0,001 atm (Frioni, L., 1999; Azcón – Bieto F. and Talón M., 2000).

La taxonomía actual de los rizobios se basa en un enfoque polifásico que incluye morfología, bioquímica, fisiología, genética y filogenia, entre otras. El uso del enfoque polifásico ha conferido a la taxonomía una base más natural y más confiable (Gillis, M. et al., 2001). Hasta la fecha se han descrito más de 40 especies, divididas en 6 géneros, para las bacterias que forman nódulos en leguminosas: *Allorhizobium, Azorhizobium, Bradyrhizobium, Mesorhizobium, Rhizobium* y *Sinorhizobium* (Lodeiro, A. R. et al., 2003). Todas ellas son bacilos aeróbicos Gram-negativos en el phylum BXII, *Proteobacteria* (Garrity, G. M. and Holt, J. G., 2001). Las células tienen formas irregulares (curvas, en forma de "X" o de "Y", llamadas bacteroides) dentro de los nódulos. Los bacteroides son las formas diferenciadas que fijan nitrógeno. Todos los rizobios pueden vivir muy bien como saprófitos en los suelos o en medios de cultivo, en donde pueden utilizar una gran variedad de azúcares como fuente de carbono.

En la definición taxonómica de estas bacterias también se incluyen características distintivas tal como la descripción del rango de huéspedes, las características del crecimiento en determinados medios de cultivo, la forma de fijación de nitrógeno. Así, algunos rizobios tienen un rango más amplio de plantas huéspedes que otras, *B. japonicum* y S. fredii son capaces de nodular un gran número de leguminosas, mientras que *S. meliloti* ha sido aislado principalmente de las plantas del género *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella*. El género *Azorhizobium* contiene cepas que forman nódulos de tallos y de raíces y fijan nitrógeno en condiciones de vida libre y simbiótica. Las cepas de *Bradyrhizobium* crecen lentamente (colonias de 1-2 mm después de 5 a 7 días de incubación) y producen álcali en medio LMA, mientras que los géneros *Rhizobium*, *Allorhizobium* y *Sinorhizobium* son bacterias que crecen

rápido (colonias mayores a 2mm después de 3 a 5 días de incubación) y producen ácido en medio LMA (Wang, T. and Romero-Martinez, J., 2005).

Ecología de los Rizobios

Los rizobios no son organismos unicelulares autónomos y uniformes, pueden formar estructuras complejas, comunicarse entre sí, modificar sus estados metabólicos y adquirir estados diferentes para un mismo proceso fisiológico. Además los rizobios pueden intercambiar material genético no sólo entre miembros de la misma especie sino entre especies diferentes con lo cual las poblaciones de rizobios en el suelo tienen un alto grado de plasticidad y adaptabilidad (Lodeiro, A. R. et al., 2003).

Los rizobios interactúan de diversas maneras con las otras especies que habitan el suelo. Aparte de sus interacciones bien conocidas con las leguminosas y otras especies de plantas, también se sabe que las lombrices juegan un papel activo en la dispersión de los rizobios en el perfil superficial del suelo, que los protozoos pueden ser predadores de los rizobios y que las pseudomonas fluorescentes no antagonizan los rizobios, pudiendo observarse efectos benéficos en inoculaciones combinadas de estas dos especies sobre leguminosas (Madsen, E. L. and Alexander, M., 1982; Jjemba, P. K., 2001; Marek-Kozaczuk, M. et al., 2000).

Poblaciones de rizobios en el suelo y competición

Los rizobios son habitantes comunes de los suelos agrícolas, pueden ser oriundos de dichos suelos 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. Las poblaciones de rizobios introducidos, que permanecen en el suelo, seguramente son cepas de alta calidad simbiótica puesto que de otra manera, no se hubieran usado en los inoculantes; sin embargo esas mismas cepas podrían modificarse genéticamente en el suelo para dar origen a poblaciones poco efectivas (Lodeiro, A. R. et al., 2003).

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 nitrógeno, el problema no reviste mayor gravedad puesto que el cultivo obtendrá el nitrógeno necesario del inoculante o de los rizobios del suelo por igual. En cambio, cuando el potencial de fijación de nitrógeno de las poblaciones del suelo es deficiente como ocurre en la mayoría de los casos, el problema de la competición se vuelve grave (Lodeiro, A. R. et al., 2003).

Como puede esperarse toda condición que limite la multiplicación o la supervivencia de los rizobios afectará su competitividad. De particular importancia en este aspecto son las condiciones de limitación de nutrientes o de estrés ambiental. De la misma manera, toda alteración que afecte aquellos componentes de los rizobios que se requieren en mayor o menor medida para la infección y la invasión de los nódulos, también afectará la competitividad (Del Papa F. et al., 2003). Así se ha asociado la competitividad a factores tales como la tolerancia al estrés, la producción de bacteriocinas (proteínas con actividad bactericida o bacteriostática sobre especies susceptibles), la producción de sideróforos (quelantes, ferro-específicos, que proveen Fe a la célula), la susceptibilidad a los protozoos predadores, las capacidades de sintetizar rizopinas (fuentes de carbono específicas) y de utilizar ciertos metabolitos en la rizosfera, las características de los polisacáridos superficiales bacterianos, la producción de flagelos y fimbrias, la sensibilidad de respuesta a los flavonoides, etc. (Toro, N., 1996; Noya F. et al., 1996).

Género *Sinorhizobium*: Son bacilos que miden 0.5-1.0 x 1.2-3.0 µm (Figura 5). Este género se separó de *Rhizobium* principalmente debido a las diferencias en las secuencias de genes 16S ARNr sin embargo no hay características fenotípicas específicas conocidas que distingan estos dos géneros. Las ocho especies dentro de este género crecen rápidamente y producen ácido en medio LMA. Se han identificado tres copias del gen ribosomal en ellas. Plásmidos grandes e incluso megaplásmidos son comunes en estas especies y en algunos casos los genes simbióticos están localizados en un megaplásmido. La especie tipo, *S. meliloti* fue transferida del género *Rhizobium* y ha sido estudiada extensamente. En esta especie son comunes dos megaplásmidos, megaplásmido 1 (plásmido Sym) y megaplásmido 2 (plásmido Exo), con respectivos pesos moleculares de 1700 y 1400 kbp. En varios laboratorios se obtuvo las secuencias completas del cromosoma y los megaplásmidos. Además de la especie tipo, otras especies de este género son: *S. arboris, S. fredii, S. kostiense, S. medicae, S. saheli, S. terangae* y *S. xinjiangense* (Garrity, G. M. and Holt, J. G., 2001; Chen, W. X. et al., 1988; De Lajudie, P. et al., 1994).

Características fisiológicas y genéticas del rizobio nodulador de alfalfa (Lodeiro, A. R. et al., 2003)

Especie: *Sinorhizobium meliloti*.

Fuente de carbono utilizada: hexosas, glicerol, manitol, ácidos orgánicos.

Velocidad de crecimiento: rápido.

pH al cual son viables: prefieren un pH de suelo de 6.5 – 7.5 , aunque toleran niveles tan altos como 8.5 – 9.0 y tan bajos como 6.0. Entre 5.6 y 6.0 tienen probabilidad de supervivencia solamente en la rizósfera de la alfalfa, mientras que por debajo de 5.6 existe poca supervivencia.

Ubicación de genes nod: plásmidos simbióticos.

% G+C del ADN: 62 - 63.

Variación del pH: acidifica el medio LMA.

Figura 5: *Sinorhizobium meliloti*.

INTERACCIONES PLANTA-MICROORGANISMO

Nodulación

Colonización rizosférica

Los rizobios en vida libre pueden permanecer durante largos períodos en el suelo, aún en ausencia de leguminosas. Cuando las raíces de las plantas penetran en el suelo se producen cambios importantes en la composición química de la solución del suelo debido a que exudan una variedad de aminoácidos, proteínas, azúcares, carbohidratos complejos, flavonoides, alcoholes, vitaminas, hormonas y ácidos orgánicos. Se ha estimado que las plantas pueden liberar de esta forma más de un 20% de su peso seco (Kluepfel, D. A., 1993). Este ambiente enriquecido en nutrientes puede promover el crecimiento de las poblaciones rizobianas del suelo y su movilización hacia las raíces merced a su quimiotaxis positiva hacia muchos de esos compuestos, en forma inespecífica, o en forma selectiva hacia ciertos flavonoides liberados por su hospedante simbiótico (Gaworzewska, E. T. and Carlile, M. J., 1982; Caetano Anollés et al., 1988). Además, las propias raíces en su proceso de desarrollo pueden encontrar rizobios libres. El resultado de todos estos procesos es la colonización de una zona

del suelo en íntimo contacto con las raíces, sujeta a influencias físicas y biológicas por ellas, que se conoce como rizosfera (Lodeiro, A. R. et al., 2003).

En la etapa previa a la infección, la población de rizobios en la zona de la raíz aumenta hasta 100 veces más de lo que aumentan las poblaciones no rizosféricas (Fahraeus, G. and Ljunggren, H., 1968).

El proceso de nodulación

Se conocen bien las etapas de desarrollo e infección de nódulos radicales (Figura 6). Estas incluyen: (Wang, T. et al., 2005)

1. Reconocimiento tanto por parte de la planta como de la bacteria, y adherencia de la bacteria a los pelos radicales.
2. Invasión del pelo radical y formación de un canal de infección.
3. Desplazamiento de las bacterias hacia la raíz principal a través del canal de infección.
4. Diferenciación de las bacterias en bacteroides y formación del nódulo radical maduro.

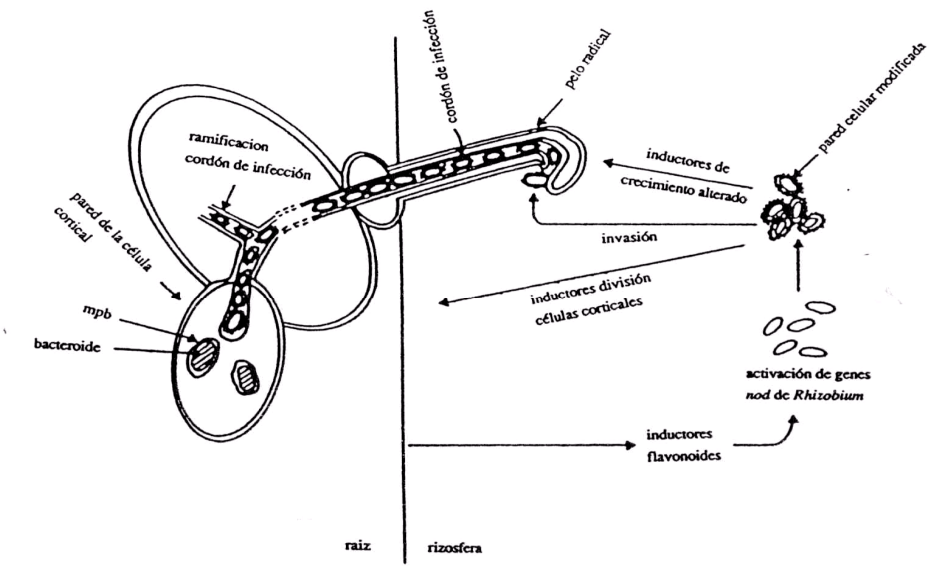


Figura 6: Proceso de nodulación (Racca, R., conferencia dictada 2007).

Reconocimiento simbiótico y adherencia de la bacteria a los pelos radicales

La unión o adsorción de los rizobios a la raíz es el evento más temprano de contacto físico entre la planta y los rizobios y depende de múltiples factores, tanto de la bacteria (p.ej. polisacáridos y proteínas superficiales, fimbrias, microfibrillas de celulosa), de la planta (p.ej. proteínas y moléculas pequeñas liberadas en los exudados radiculares, estructura de las

superficies radiculares en las distintas zonas de la raíz), como del ambiente (cationes divalentes, pH, temperatura, humedad, presencia de otros microorganismos competidores) (Lodeiro, A. R. et al., 2003).

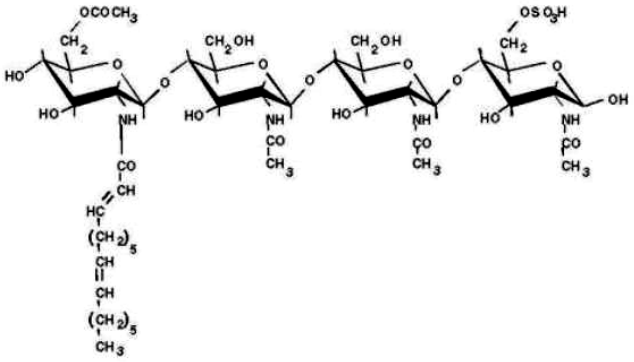
La primera señal la provee la planta. Las plantas leguminosas secretan compuestos, moléculas de bajo peso molecular (flavonoides, isoflavonoides y betaínas), estos flavonoides a concentración nanomolar, provocan quimiotaxis activa en los rizobios hacia la superficie radical; y a concentración micromolar, activan los genes de la bacteria responsables de la nodulación (genes *nod*) (Wang, T. et al., 2005; Azcón – Bieto F. and Talón M., 2000). Este proceso tiene cierta **especificidad** ya que las leguminosas secretan flavonoides específicos para atraer a rizobios específicos, de este modo, los grupos de inoculación cruzada entre plantas y rizobios también tienen su paralelo entre flavonoides y rizobios (Lodeiro, A. R. et al., 2003). En la Tabla 1 se especifican los flavonoides secretados por distintas partes de las plantas de alfalfa.

Tabla 1: Flavonoides secretados por la alfalfa.

Leguminosa	Fuente	Flavonoides producidos
Medicago sativa (alfalfa)	semilla	luteolina, crisoeriol
	raíz	liquiritigenina;7,4´dihidroxiflavona; 4,4´dihidroxi- 2´-metoxichalcona

En respuesta a la señal de la planta, los rizobios responden sintetizando otras señales **específicas**, los factores Nod, dirigidos hacia la planta hospedadora (Wang, T. et al., 2005). Todos los factores Nod caracterizados tienen una estructura básica común que consiste en un oligómero de N-acetil-D-glucosamina que lleva unido un ácido graso al nitrógeno del extremo no reductor. Debido a la semejanza estructural del oligosacárido a quitina, también se les llama LCOs (del inglés: lipo-chitin oligosaccharides). Diferentes especies de rizobios producen diferentes factores Nod, las estructuras de los mismos varían en: 1) la presencia de grupos adicionales mayormente en los extremos del oligosacárido de quitina, 2) en el tipo de ácido graso presente en el extremo no reductor y 3) en la longitud del esqueleto de oligosacárido. Estas variaciones son los determinantes mayores de la **especificidad** de hospedador (Azcón – Bieto F. and Talón M., 2000).

El rol del factor Nod es iniciar el proceso de desarrollo y diferenciación del nódulo, induciendo la despolarización de las membranas celulares vegetales y el reingreso al ciclo mitótico de las células subcorticales de la raíz que van a dar origen al primordio del nódulo (Foucher, F. and Kondorosi, E., 2000). Los genes de la bacteria implicados en la síntesis de los factores Nod son los genes nod (nodulación). Estos genes están generalmente agrupados bien en plásmidos o en una región del cromosoma. Los plásmidos que llevan los genes nod se llaman plásmidos simbióticos o pSym y pueden llegar a ser tan grandes como un tercio del total del cromosoma como en el caso de *S. meliloti*. Estos genes, a excepción de nodD, no se expresan si no se encuentra la señal inductora adecuada de la planta. El gen nodD se expresa constitutivamente y la proteína NodD tiene la capacidad de reconocer los flavonoides **específicos** secretados por la planta. Una vez activada por los flavonoides, la proteína NodD a su vez va a activar la transcripción de los genes de la nodulación (Wang, T. et al., 2005). Los genes nodABCEFG, son también denominados genes nod comunes ya que se encuentran presentes en todos los rizobios, los mismos tienen por función la biosíntesis y el ensamblaje de las unidades de N-acetil-D-glucosamina y la unión de la cadena de ácido graso, funciones comunes a todos los rizobios. Mientras que los genes de nodulación **específicos** de cada una de las especies bacterianas, codifican las enzimas que catalizan la "decoración" del factor Nod con diferentes sustituyentes en sus extremos de manera que las distintas moléculas señal presentan ligeras diferencias entre ellas (Downie, J. A., 1998). Así, en *Sinorhizobium meliloti*, la estructura es convertida a una forma sulfatada (Figura 7) por los productos de los genes de nodulación específicos nodH, nodP y nodQ (Foucher, F. and Kondorosi, E., 2000).



<u>Figura 7</u>: Estructura del factor Nod de *S. meliloti*.

En la superficie del rizobio se localiza una proteína, la ricadesina, cuya función está relacionada exclusivamente con la adherencia. Esta proteína se une al calcio y puede actuar

captando complejos de calcio en la superficie de los pelos radicales, en los estudios de la misma no se ha comprobado que intervenga en el fenómeno de especificidad antes nombrado (Wang, T. et al., 2005; Bedmar, E. J. et al., 1992). Otras sustancias, como las lectinas, las cuales son proteínas que contienen carbohidratos, también cumplen una función en la adherencia planta-bacteria. Las lectinas han sido identificadas en los extremos de pelos radicales y en la superficie de las células de rizobio (Wang, T. et al., 2005). Las lectinas de leguminosas se unen a sitios **específicos** en los exopolisacáridos o los polisacáridos capsulares de los rizobios. Estos polisacáridos extracelulares son responsables de la inhibición de los sistemas de defensa de la planta frente a la invasión rizobiana que permite la penetración del simbionte sin ser tratado como un patógeno, aún cuando todavía no haya expresado su capacidad de fijar nitrógeno (Kijne, J. W. et al., 1997).

Los polisacáridos que han sido estudiados en relación a su función en simbiosis son: exopolisacáridos (EPSs), lipopolisacáridos (LPSs), antígenos de tipo K (KPSs) y glucanos cíclicos. En general, los EPSs se requieren para nodular plantas que forman nódulos indeterminados (ej. alfalfa) y los LPSs para nodular plantas que forman nódulos determinados (ej. frijol) (Spaink, H. P., 2000).

Invasión del pelo radical y formación de un canal de infección

En paralelo con la diferenciación y desarrollo del nódulo, debe producirse la infección de la raíz por parte de los rizobios.

Después de la unión, los pelos radicales se enroscan (Figura 8) debido a la acción de los factores Nod. Algunos pelos radicales se enroscan hasta 360° formando una estructura a la que se llama "cayado de pastor" (Wang, T. et al., 2005). Los rizobios quedan atrapados en la curvatura interior del pelo radicular y posteriormente penetran al mismo mediante la secreción de celulasas, formando un hilo de infección longitudinal en dirección a las células subcorticales de la raíz donde se está formando el nódulo. Este hilo de infección contiene una matriz de origen bacteriano y glicoproteína de origen vegetal y se forma por una invaginación de la pared celular del pelo radicular (Azcón – Bieto F. and Talón M., 2000; Stuurman, N. et al., 2000).

Figura 8: Micrografía electrónica del enrulado del pelo radicular, se observan los rizobios englobados en la curvatura interior del pelo y el inicio de la formación del hilo de infección (Lodeiro, A. R. et al., 2003).

La infección de los pelos radiculares es también un fenómeno complejo. Se distinguen tres regiones de la raíz de acuerdo al desarrollo de los pelos radiculares; desde la base hacia el ápice, estas son: 1) la zona de los pelos maduros, 2) la zona de los pelos emergentes y 3) la zona apical, sin pelos radiculares. Dado que las células de la raíz permanecen en su posición a medida que la raíz se alarga por la división y alargamiento celular en su extremo apical, la posición de los nódulos indica dónde se produjeron las infecciones. Así, se pudo concluir que los pelos radiculares maduros no pueden ser infectados (Bhuvaneswari, T. V. et al., 1980).

El reconocimiento de que los pelos radiculares maduros no son infectables llevó a la conclusión de que el enrulado de los pelos radiculares ocurre por un crecimiento desigual de las paredes celulares a uno y otro lado del pelo (Lodeiro, A. R. et al., 2003). Se ha demostrado, además, que los polisacáridos extracelulares están involucrados en la infección y podría ser que contribuyan a mantener la estructura del canal por el que migran los rizobios en el hilo de infección (Fraysse, N. et al., 2003).

En alfalfa la bacteria invade la raíz unos pocos días después de la germinación de la semilla y puede haber nódulos visibles cuando ha emergido la primer hoja simple o la hoja trifoliada (White, J. G. H., 1965).

Desplazamiento de las bacterias hacia la raíz principal

Una vez que las bacterias ingresan por el canal de infección se van desplazando por el mismo hacia los nódulos en formación (Figura 9).

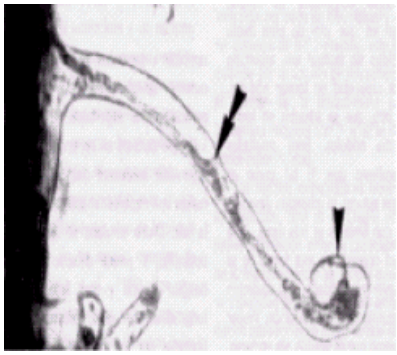


Figura 9: Micrografía del canal de infección, la flecha simple señala el enrulado en la punta del pelo radicular y la flecha doble el hilo o canal de infección por donde los rizobios migran hacia las células subcorticales de la raíz (Lodeiro, A. R. et al., 2003).

Diferenciación de las bacterias en bacteroides

Cuando las bacterias alcanzan los nódulos en formación se produce la invasión de los mismos por parte de los rizobios que provienen del hilo de infección y la diferenciación de éstos en bacteroides capaces de fijar nitrógeno. Los rizobios que se descargan del hilo de infección invaden el citoplasma de ciertas células del nódulo, que se conocen como células infectadas. En estas células se observa que el citoplasma adquiere una posición central, gracias a una reorganización de los microtúbulos y el citoesqueleto. A medida que los rizobios ingresan al citoplasma de las células infectadas son envueltos por una membrana de origen vegetal llamada membrana peribacteroidal. Una vez dentro de ésta los rizobios pueden dividirse algunas veces y luego inician el proceso de diferenciación en bacteroides (Figura 10) que consiste en general en un incremento de tamaño de las bacterias, que puede llegar a ser de diez veces el tamaño original; además, los bacteroides pueden adquirir formas redondeadas o de “Y” y es en este momento cuando se reprime la expresión de los genes de nodulación y se estimula la de los genes relacionados a la fijación de nitrógeno. Los grupos de bacteroides así diferenciados y envueltos en la membrana peribacteroidal forman cuerpos distinguibles en el citoplasma de las células infectadas, dichos cuerpos reciben el nombre de simbiosomas y es en ellos donde se va a producir la fijación de nitrógeno hasta que finalmente se inicie su degradación y senescencia (Lodeiro, A. R. et al., 2003).

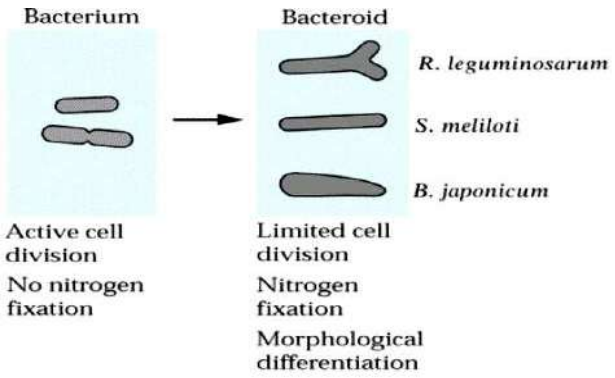


Figura 10: Transformación de los rizobios en bacteroides y características diferenciales de unos y otros.

Los bacteroides dependen totalmente de la planta para obtener la energía necesaria para la fijación de nitrógeno (Wang, T. et al., 2005). Con la diferenciación de los rizobios en bacteroides culmina la formación del nódulo y, en este momento, se puede referir al mismo como una estructura tumoral madura en la cual se puede llevar a cabo la FBN.

Tanto la diferenciación de los rizobios en bacteroides como el desarrollo de los nódulos requiere de la expresión diferencial de una gran cantidad de genes con lo cual se disparan en cada miembro del par simbiótico programas de desarrollo (Stougaard, J., 2001; Patriarca, E. et al., 2002). Por ejemplo, en *S. meliloti* se ha detectado la expresión diferencial de más de 350 genes entre el estado de vida libre y el de bacteroide (Natera, S. H. A. et al., 2000).

Tipos de Nódulos

Se pueden describir dos tipos de estructura primaria (Figura 11) (Frioni, L., 1999):

Determinados: todas las partes se diferencian a la vez y la senescencia ocurre simultáneamente, por lo que estos nódulos tienen una existencia limitada.

Indeterminados: con meristemo apical que continúa activo a través de la vida del nódulo, dando nuevos lóbulos activos.

Figura 11: Fotografía de nódulos indeterminados de alfalfa (izquierda) y nódulos determinados de soja (derecha) (Racca, R., conferencia dictada 2007).

Los nódulos indeterminados, como los de alfalfa, tienen un aspecto alargado y en ellos se distinguen cuatro zonas transversales que se suceden desde el ápice del nódulo hacia la base (Figura 12), zona I o meristemática (ubicada en el ápice, continuamente suministra células que van a ser invadidas y donde se va a producir la diferenciación de los bacteroides y simbiosomas), zona II o de simbiosomas en diferenciación, zona III o zona de simbiosomas fijadores de nitrógeno y zona IV o senescente (a medida que van envejeciendo los nódulos indeterminados poseen porciones cada vez mayores de esta zona) (Lodeiro, A. R. et al., 2003).

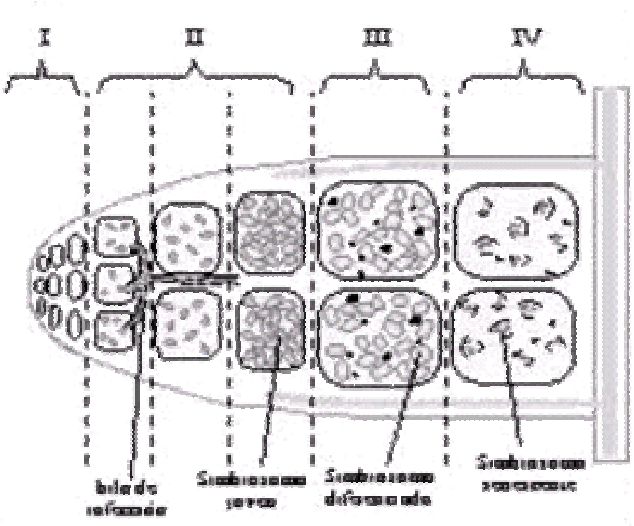


Figura 12: Corte longitudinal de un nódulo indeterminado (Lodeiro, A. R. et al., 2003).

Nódulos efectivos e inefectivos en alfalfa

En la planta joven los nódulos eficientes se agrupan generalmente en la raíz principal inmediatamente debajo del cuello de la raíz y en las raíces laterales. Los nódulos son grandes y cilíndricos, provistos de varios lóbulos e interiormente pueden ser rojos o rosados. Esta coloración obedece a la presencia de leghemoglobina, que interviene en el proceso de regulación del oxígeno al sistema de la nitrogenasa (Bergensen, F. J., 1971). Los nódulos ineficientes son pequeños y numerosos, blancos o verdes y se encuentran dispersos por todo el sistema radical (Nutman, P. S., 1956).

Fijación de Nitrógeno

La Fijación de Nitrógeno puede ser abiótica o biológica. Por la primera se forman:

- óxidos como consecuencia de la combustión de compuestos inorgánicos, descargas eléctricas, etc., que son arrastrados al suelo por la lluvia, procesos de importancia cuantitativa menor (Halbleid, C. M. and Luden, P. W., 2000; Frioni, L., 1999):

$N_2 + O_3 \longrightarrow$	$N_2O + O_2$	Ozonización del N_2
$N_2O \longrightarrow$	$NO + N$	Fotólisis del N_2O
$NO + O_3 \longrightarrow$	$NO_2 + O_2$	Ozonización del NO
$3\ NO_2 + H_2O \longrightarrow$	$2\ HNO_3 + NO$	Hidratación del NO_2
$NH_3 + O \longrightarrow$	NO_3^-	Oxidación del NH_3

- o bien amonio por el proceso Haber-Bosch, principal vía de producción de fertilizantes nitrogenados, llevada a cabo por la reacción mediante la cual el nitrógeno es reducido por el hidrógeno a temperaturas y presiones muy elevadas (aproximadamente 500-1000 °C y 200-500 atm) y con catálisis inorgánica (Halbleid, C. M. and Luden, P. W., 2000; Azcón – Bieto F. and Talón M., 2000):

$$N_2 + H_2 \longrightarrow 2\ NH_3$$

Estas condiciones tan drásticas se requieren para romper el triple enlace N≡N de la molécula de nitrógeno gaseoso, que es muy estable, con una energía de enlace de 942 kJ mol^{-1}.

Debido a que la utilización de fertilizantes conlleva un costo económico considerable, al ser su producción dependiente de la energía derivada de los combustibles fósiles, y, además, constituye un riesgo potencial de contaminación y eutrofización de las aguas dulces por lixiviación del nitrato de los suelos, se han incentivado las investigaciones sobre la **fijación**

biológica de nitrógeno (FBN) la cual representa una alternativa económica y ecológicamente limpia frente a la fijación química. Además, la fijación biológica desempeña un papel muy importante en la economía del nitrógeno en la práctica agrícola, ya que la cantidad de nitrógeno disponible en la mayoría de los suelos cultivados es baja y en la actualidad no puede ser suplementada a escala mundial por la producción de fertilizantes (Frioni, L., 1999; Azcón – Bieto F. and Talón M., 2000).

La fijación biológica de nitrógeno es catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa, que se encuentra exclusivamente en microorganismos procariotas. El espectro de organismos diazotrofos o fijadores de nitrógeno es muy amplio, hasta el punto de que éstos pueden encontrarse en casi cualquier hábitat (Azcón – Bieto F. and Talón M., 2000). Estos son capaces de otorgar nitrógeno a la planta a temperatura ambiente y a presión atmosférica, para ello utilizan sistemas muy eficaces para el transporte de electrones (óxido-reducción) y el intercambiador energético adenosina trifosfato (ATP), que es el dador de energía para la mayoría de las reacciones biosintéticas (Lodeiro, A. R. et al., 2003). Dentro de los organismos diazótrofos se encuentran dos tipos de bacterias: de vida libre, las cuales fijan el nitrógeno en el suelo, o simbióticas (Wang, T. et al., 2005). Estas simbiosis implican el intercambio de señales entre la planta y las bacterias, que culmina con la formación de los nódulos, normalmente localizados en la raíz, dentro de los cuales ocurre la fijación de nitrógeno; en este grupo encontramos a las bacterias conocidas como rizobios (Azcón – Bieto F. and Talón M., 2000). En esta simbiosis en los nódulos, la planta huésped obtiene nutrientes nitrogenados de la bacteria (rizobios) y ofrece a ésta una fuente de carbono y un ambiente favorable para fijar nitrógeno (Wang, T. et al., 2005).

Especificidad de la asociación simbiótica rizobio - leguminosa

La eficacia de la simbiosis depende del correcto apareamiento de los rizobios y la planta huésped (Burton, J. C., 1972). Al referirse a este tema se está haciendo mención al fenómeno de **especificidad** que se da entre los rizobios y las leguminosas al momento de establecer la simbiosis. Los suelos contienen diferentes y numerosas bacterias fijadoras de nitrógeno, pero existe especificidad en la infección entre los pares bacteria-planta en la interacción *Rhizobium*-leguminosa, la cual va más allá del nivel de familia, llegándose a encontrar, incluso, selectividad a nivel cepa-variedad (Bohlool, B. B. and Schmidt, E. L., 1974; Sadowski, M. J. and Graham, P., 1998). De esta forma se puede decir que cada rizobio interacciona con una o muy pocas especies de plantas estrechamente relacionadas (Bedmar, E. J. et al., 1992). Así surge el concepto de grupos de inoculación cruzada que establece la

compatibilidad entre grupos de especies de leguminosas y grupos de rizobios, encontrando el correspondiente par que incluye a la leguminosa de interés en el presente trabajo, la alfalfa (Tabla 2) (Lodeiro, A. R. et al., 2003):

Tabla 2: Grupo de inoculación cruzada de *S. meliloti*.

Rizobio nodulante y fijador de Nitrógeno	Leguminosa Huésped
Sinorhizobium meliloti	*Medicago sativa, M. truncatula, Melilotus alba, Trigonella spp.*

Dentro de la familia de las leguminosas la especificidad es mayor entre leguminosas de clima templado que entre las especies tropicales (Freire, J. R. J., 1992). En el caso de la alfalfa, la misma presenta una marcada especificidad a nivel cepa-variedad la cual ha sido estudiada por distintos investigadores (Gibson, A. H., 1962; Erdman, L. W. and Ura Mae Jeans, 1953; Burton, J. C. and Erdman, L. W., 1940; Burton, J. C. and Wilson, P. W., 1939; Brockwell, J. and Hely, F. W., 1961; Brockwell, J. and Hely, F. W., 1966; Denton, M. D. et al., pág. web). Igualmente dentro de las especies tropicales, también, hay ocurrencia de pares con alta especificidad (Freire, J. R. J., 1992).

Este fenómeno de la especificidad en la interacción *Rhizobium*-leguminosa es un factor importante a tener en cuenta al momento de la formulación de un inoculante por ejemplo para realizar la búsqueda de pares simbióticos planta-rizobio fuertemente selectivos que excluyan a otras especies indeseables que podrían estar presentes en el suelo (Favelukes, G. et al., 1996; Labandera, C., pág. web).

En este campo de estudio un sustento importante es el creciente conocimiento del proceso de la asociación simbiótica en sus aspectos genéticos, bioquímicos, fisiológicos y morfológicos. Se destacan los notables hallazgos sobre las tempranas interacciones genético-moleculares con intercambio de señales que conducen a ambos simbiontes a la infección de la raíz e iniciación del nódulo, y determinan su selectividad simbiótica (Long, S. R., 1989; Dénarié, J. and Cullimore, J., 1993; van Rhijn, P. and Vanderleyden, J., 1995). Así, la especificidad propia de cada asociación simbiótica es la resultante de la especificidad y capacidad discriminativa en las interacciones entre señales y receptores en uno y otro simbionte, las cuales ya fueron nombradas anteriormente más en detalle, pero que de manera sintética se pueden nombrar como elementos intervinientes en la determinación de la misma: los

flavonoides específicos para algún rizobio en particular exudados por la planta, el factor Nod sintetizado por el rizobio en respuesta hacia los mismos, la lectina vegetal, los polisacáridos de envoltura de los rizobios a los cuales es capaz de unirse selectivamente la lectina vegetal (en el caso de *S. meliloti* sólo los LPS), en el caso de algunos rizobios la presencia de determinados cationes divalentes (como el calcio en *S. meliloti* el cual ancla la ricadesina, que permite la unión inespecífica a la planta, a la superficie del rizobio) (Bedmar, E. J. et al., 1992; van Eijsden, R. et al., 1995; Lagares, A., 1989; Lagares, A. and Favelukes, G., 1990).

Esta especificidad rizobio-huesped puede ser afectada tanto por factores bióticos, por ejemplo por la transferencia del plásmido simbiótico de una especie de *Rhizobium* a otra; como por factores abióticos, por ejemplo la ausencia de calcio en el suelo en el caso de la simbiosis *S. meliloti*-alfalfa, la temperatura que afecta tanto la planta como la bacteria en cuyo caso se alteran compuestos esenciales como proteínas y lípidos, o el pH, siendo *S. meliloti* una de la especies más influídas por la acidez (Bedmar, E. J. et al., 1992; Grassano, A. 1990).

La fijación de nitrógeno por los rizobios

Los rizobios para poder llevar adelante la fijación de nitrógeno en los nódulos necesitan que se cumplan determinados requisitos entre los cuales podemos nombrar:

Poder reductor: numerosos compuestos orgánicos pueden ser empleados por los microorganismos fijadores heterótrofos como poder reductor. En los organismos fotosintéticos la fuente de poder reductor proviene del flujo electrónico derivado de la clorofila. La ferredoxina y la flavodoxina pueden actuar como donadores de electrones. Las ferredoxinas son proteínas – SFe capaces de reducir la nitrogenasa. Las flavodoxinas son proteínas sin hierro que poseen un flavin mononucleótido (FMN) como grupo prostético, las mismas son capaces de transportar dos electrones (Frioni, L., 1999).

Energía (ATP): un importante hecho agronómico de la FBN es que es una reacción energéticamente desfavorable. El costo exacto en la simbiosis con leguminosas en términos de ATP empleado es motivo de polémica. Desde que la transferencia de cada electrón de los 8 involucrados en la reacción requiere la hidrólisis de 2 ATP, significa que un mínimo de 16 ATP se requieren por molécula de nitrógeno reducida. En la práctica el costo es más alto, debido a la ineficiencia de la actividad de la nitrogenasa y a costos asociados al desarrollo y mantenimiento del nódulo, a la asimilación y el transporte de amonio. Las estimaciones en la literatura varían bastante, un dato generalmente reconocido se sitúa en 28 moles de ATP por mol de nitrógeno, excluyendo los costos adicionales (Frioni, L., 1999).

Esqueletos carbonados de la FBN: La energía necesaria para la FBN proviene originariamente de la fotosíntesis. El compuesto carbonado más importante transportado desde la parte aérea a los nódulos, vía floema, es la sacarosa. En las células nodulares, la sacarosa se hidroliza a monosacáridos por la actividad de las enzimas invertasa alcalina (que produce glucosa y fructosa) y sacarosa sintasa (que cataliza la reacción reversible sacarosa + UDP <-----> fructosa + UDP-glucosa). Los monosacáridos son hidrolizados a través de la ruta glucolítica, hasta la obtención de fosfoenolpiruvato. La fosfoenolpiruvato carboxilasa, una enzima citosólica muy abundante en los nódulos cataliza la incorporación de hasta un 10% del CO_2 respiratorio (realmente HCO_3^-, ya que el CO_2 debe estar disuelto) al fosfoenolpiruvato para producir oxalacetato. El oxalacetato, bastante inestable, es reducido rápidamente a malato por la malato deshidrogenasa. El malato puede ser utilizado como fuente de carbono y energía para los bacteroides, entrar en la mitocondria y ser oxidado por el ciclo de Krebs o contribuir a la asimilación del amonio en el ciclo glutamina sintetasa/glutamato sintasa. También se originan pequeñas cantidades de productos de fermentación como etanol, lactato y acetaldehído. El que uno o varios de los compuestos de carbono citados sean utilizables por los bacteroides como fuente de energía y carbono, depende de la velocidad de incorporación de éstos en los bacteroides, lo que es determinado, a su vez, por la velocidad de transporte a través de la membrana simbiosomal. Dicha membrana es altamente permeable a succinato y malato, esto se debe a que existe un sistema transportador de dicarboxilatos en dicha membrana con alta afinidad por los mismos. Una vez incorporados, los ácidos dicarboxilícos son oxidados actuando como donadores de electrones para la producción de ATP y, tras su conversión en piruvato, como última fuente de electrones para la reducción del nitrógeno (Wang, T. et al., 2005; Azcón – Bieto F. and Talón M., 2000).

Metales: el magnesio reacciona con el ATP para dar la sal monomagnésica, que reacciona con la nitrogenasa. Otros minerales presentes en la nitrogenasa son el hierro y el molibdeno (Frioni, L., 1999).

Nitrogenasa: enzima responsable del la reducción, integrada por dos componentes, metalo proteínas:

1) Componente I, o Mo-Fe proteína.
2) Componente II, o Fe proteína.

El oxígeno inhibe la síntesis de la nitrogenasa e inactiva irreversiblemente la Fe-proteína (vida media en aire ≈45 seg. a unos pocos min) y MoFe-proteína (vida media en aire ≈4.5-60 min) (Azcón – Bieto F. and Talón M., 2000). Por lo tanto, la fijación de nitrógeno requiere

igualmente de sistemas de protección de la nitrogenasa frente al oxígeno (Figura 13) (Lodeiro, A. R. et al., 2003).

Por el lado de la planta, esta protección la confiere una capa celular exterior, localizada en el cortex interno, que envuelve al nódulo formando una barrera de protección a la difusión del oxígeno de la atmósfera del suelo, que se intensifica aún más en situaciones de estrés hídrico o salino. Además, la planta suministra al nódulo una proteína muy similar a la hemoglobina de nuestra sangre, llamada leghemoglobina (Lb), que es capaz de unir y transportar oxígeno con gran afinidad. Dentro de las células infectadas, la Lb se encuentra exclusivamente en el citosol, y no en el espacio peribacteroidal (Lodeiro, A. R. et al., 2003). La concentración de oxígeno unido a la Lb es 50.000 veces mayor que la concentración de oxígeno en el citosol de las células infectadas. Es decir, prácticamente todo el oxígeno que alcanza los bacteroides es transportado por la Lb, mientras que una cantidad casi insignificante, llega como oxígeno libre, por simple difusión, lo que resulta en concentraciones de oxígeno extremadamente bajas en el nódulo. La leghemoglobina ha sido catalogada como una nodulina, debido a que el gen que codifica dicha proteína en las plantas sólo se expresa en los nódulos fijadores de nitrógeno (Lodeiro, A. R. et al., 2003).

Por el lado de los rizobios, se requiere un sistema de detección del oxígeno para regular la síntesis de la nitrogenasa pero además, dado el alto requerimiento energético de la fijación de nitrógeno, se requiere mantener operativo el sistema de trasporte de electrones (respiración aeróbica) aún con las bajísimas concentraciones de oxígeno presentes en el interior del nódulo. Para ello, los rizobios expresan unos citocromos de alta afinidad por el oxígeno sólo cuando se ha completado su diferenciación en bacteroides (Fisher, H. M., 1994).

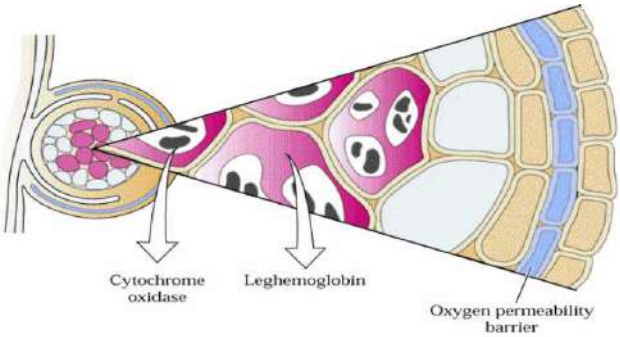


Figura 13: Mecanismos para controlar el nivel de oxígeno en los nódulos (Sannazzaro, A., conferencia dictada 2007).

En el caso de nódulos indeterminados, como los de alfalfa, además hay una compartimentación espacial que constituye un elemento más que protege la nitrogenasa del oxígeno (Figura 14) (Sannazzaro, A., comunicación oral).

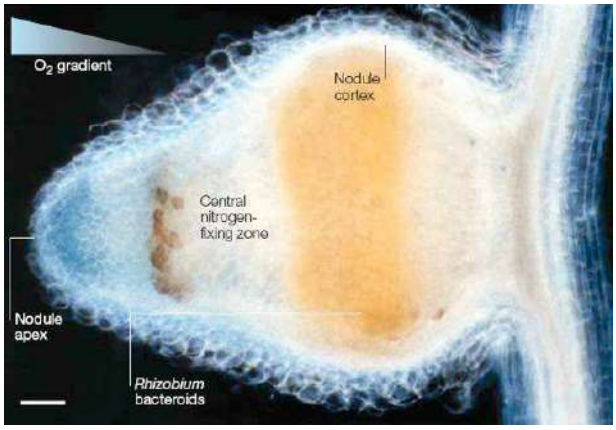


Figura 14: Compartimentación espacial en nódulos indeterminados, uno de los elementos que protege la nitrogenasa del oxígeno (Sannazzaro, A., conferencia dictada 2007).

Reacción biológica de reducción de nitrógeno en amoníaco

$$N_2 + 8\ H^+ + 8\ e^- + n\ ATP \rightarrow 2\ NH_3 + H_2 + n\ ADP + n\ Pi$$

Transferencia del nitrógeno fijado a la planta

El amoníaco producido durante la reducción del N_2 se libera al espacio peribacteroidal, donde predominan condiciones de acidez que desplazan el equilibrio $NH_3 + H^+ \longleftrightarrow NH_4^+$ hacia la formación de amonio, el cual a diferencia del amoníaco, no puede atravesar las membranas del bacteroide debido a su carga. Dado que el transportador de amonio hacia el interior del bacteroide está ausente porque su síntesis fue inhibida como parte del programa de diferenciación del bacteroide, la única ruta posible para dicho amonio es transformarse en aminoácidos o ureidos en las células del nódulo para luego continuar hacia el xilema de la planta hacia la parte aérea de la planta (Figura 15) (Temple, S. J. et al., 1998). Las leguminosas de origen templado (alfalfa, guisante, trébol) exportan el nitrógeno en forma de amidas, como la glutamina, la asparragina y la 4-metilenglutamina. Esto podría deberse a que los nódulos de crecimiento indeterminado, propios de estas leguminosas, presentan abundantes ramificaciones y, por tanto, una mayor resistencia al flujo de agua, lo que

probablemente impida mantener los ureidos en forma soluble (Azcón – Bieto F. and Talón M., 2000).

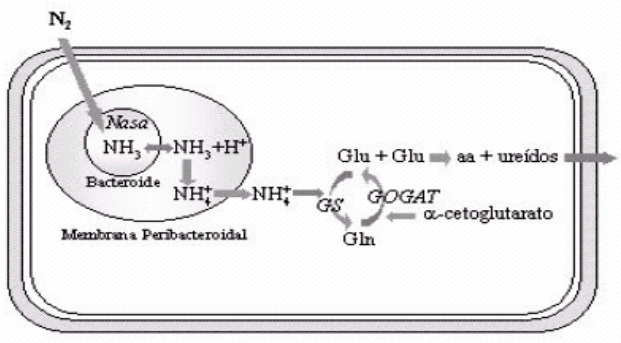


Figura 15: Transformación del nitrógeno fijado en compuestos traslocables por las plantas (Lodeiro, A.R. et al., 2003).

Competición para la nodulación

Cada nódulo en general está ocupado, invadido, 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 nitrógeno total fijado como aminoácidos o ureidos. 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, M. J. and Graham, P., 1998).

Objetivo

Al conocer que en muchos de nuestros suelos existen naturalmente cepas nativas o naturalizadas de rizobios, pero que las mismas, a menudo, fallan en producir una simbiosis efectiva debido al escaso número o a la ausencia de especificidad con la leguminosa a implantar; se pone de manifiesto que el aprovechamiento de esta asociación simbiótica requiere de la inoculación de la leguminosa con una concentración adecuada del rizobio correspondiente la cual va a ser esencial para una nodulación efectiva (González, F., pág. web; Azcón – Bieto F. and Talón M., 2000; Lodeiro, A. R. et al., 2003).

Para la producción de un inoculante de alta calidad, la primera etapa debe consistir en la selección de la/s cepa/s a utilizar. Por lo tanto, en la búsqueda de la optimización en la obtención de inoculantes resulta de suma importancia atender al fenómeno de **especificidad** que se da entre los rizobios y las leguminosas al momento de establecer la simbiosis.

Es entonces, que en función de lo expresado anteriormente **se plantea como hipótesis de trabajo que hay una especificidad huésped-cepa que está determinada tanto por factores bióticos como abióticos; siendo el objetivo del presente trabajo verificar si en las condiciones bióticas y abióticas planteadas, la especificidad *S. meliloti* - *M. sativa* se mantiene constante.**

Materiales y Métodos

Semillas

Se trabajó con cuatro cultivares de semillas, cada uno con un origen distinto:

- Semilla originaria de Chile.
- Semilla originaria de Uruguay, ecotipo desarrollado en tal país identificado como Chaná.
- Semilla importada, provista por el INTA Anguil debido a su amplio uso en Argentina identificada como Sequel.
- Semilla argentina, originaria de la provincia de La Pampa, ecotipo desarrollado en la zona identificado como Ecotipo Pampeano.

Microorganismos

Las cuatro cepas de *Sinorhizobium meliloti* utilizadas son recomendadas para su uso en distintos países coincidiendo el mismo con el de las semillas también en estudio:

- Cepa A55, recomendada en Chile para la producción de inoculantes comerciales.
- Cepa U143, recomendada en Uruguay para la producción de inoculantes comerciales.
- Cepa B399, recomendada por el INTA – Castelar para la producción de inoculantes comerciales en Argentina.
- Cepa Lq51, aislada de la provincia de La Pampa, cuya caracterización y desarrollo fue realizado por docentes del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UNLPam (Grassano, A. et al., 2002).

Todas las cepas, exceptuando la cepa A55, fueron purificadas en placas haciéndolas crecer de 5 a 7 días en estufa a 28-30°C (Figura 16). Todas fueron conservadas en heladera (5°C) en tubos de ensayo con medio en pico de flauta (Figura 17). El medio utilizado tanto para la purificación como para la conservación fue el medio LMA (Tabla 3).

Tabla 3: Medio de mantenimiento LMA (Extracto de levadura - Manitol - Agar).

Componentes	Cantidad (g/l)
Manitol	10
Extracto de Levadura	0.5
NaCl	0.2
K_2HPO_4	0.5
$MgSO_4$ $7H_2O$	0.1

$FeCl_3$ $6H_2O$	0.01
Agar	15

pH: 6.8

Figura 16: Placa con medio LMA (Tabla 3) donde se puede observar el crecimiento de cepas purificadas.

Figura 17: Tubo pico de flauta con medio LMA (Tabla 3), método de conservación de las cepas en heladera.

Para la purificación de la cepa A55 se inoculó plantas de alfalfa procediendo de igual manera que el ensayo en cámara -más adelante detallado-, cuando se observó buena nodulación se realizó la extracción de los nódulos de las raíces, se los lavó con agua destilada y conservó en tubos eppendorf en freezer. Luego se procedió al aislamiento de la bacteria a partir de los nódulos, para lo cual los mismos fueron rehidratados en agua destilada durante una hora; después se esterilizaron colocándolos en un vaso de precipitado con etanol al 95% en agitación durante 30 segundos, luego se los sumergió en NaClO al 5% durante 3 minutos, practicándoles a continuación se les practicaron 5 lavados de aproximadamente 30 segundos cada uno con H_2O destilada estéril en un vaso de precipitado estéril y pasándolos a otro vaso de precipitado estéril que contenía H_2O destilada estéril; una vez estériles, se fueron tomando con pinza estéril de a uno y machacando sobre una placa de Petri con medio LMA, con un anza estéril se estrío el resto líquido que dejó el nódulo y se dejó crecer en estufa a 28°C durante 5-7 días. Una vez desarrollados los microorganismos se conservaron de igual manera que el resto de las cepas.

Medios de Cultivo

El desarrollo bacteriano, tanto para caracterizar las cepas realizando las correspondientes curvas de crecimiento como para proceder a la inoculación de las plantas en cámara, se realizó en los medios inóculo y proceso, indicados como Medio 1 y Medio 2 en la Tabla 4 (Ballati, A. P. and Freire, J., 1996).

Tabla 4: Composición de los medios de cultivo.

Componentes (g/l)	**Inóculo (Medio 1)**	**Proceso (Medio 2)**
Manitol	5.0	10.0
Extracto de levadura	2.0	4.0
NaCl	0.1	0.1
K_2HPO_4	0.5	0.5
$MgSO_4$ $7H_2O$	0.2	0.2
$FeCl_3$ $6H_2O$ (*)	2 gotas	2 gotas
$MnSO_4$ $4H_2O$ (*)	2 gotas	2 gotas
KNO_3	0.8	0.8

*Solución al 10%

pH: 6.8

Desarrollo de las cepas de *S. meliloti*

Erlenmeyers de 250 ml con 50 ml de Medio 1 de Tabla 4 esterilizados en autoclave a 121°C durante 20 minutos, fueron sembrados con cada una de las cepas transfiriendo dos ansadas de los tubos picos de flautas donde se conservaban. Luego se colocaron en agitador rotatorio a 250 rpm y 2.5 cm de excentricidad ubicado en un cuarto de estufa a 28°C durante 24 hs.

Los procesos se desarrollaron en erlenmeyers de 500 ml con 100 ml de Medio 2 de Tabla 4 esterilizados en las mismas condiciones que los inóculos. Luego de 24 hs de desarrollo de los inóculos cuando se transfirieron 10 ml a los correspondientes medios procesos de manera de asegurar en el inicio de los mismos una concentración del orden de 10^8 células viables/ml. Una vez sembrados fueron colocados en agitador rotatorio en cuarto de estufa en las condiciones ya mencionadas.

Medidas de concentración celular

El crecimiento celular fue evaluado en base a medidas de densidad óptica a 600 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Metrolab VD 40, cada 3 hs durante 66 horas de desarrollo en los medios procesos.

Control de pureza de los caldos fermentados

Para controlar la pureza de los caldos en los proceso de fermentación se realizaron periódicamente cada 3 hs observaciones de los mismos en un microscopio de contraste de fase y mediciones de pH.

Electroforesis de isoenzimas

Para la caracterización de las cepas bacterianas utilizadas, además de realizar la curva de crecimiento de las mismas, se empleó el método de MLEE en gel de poliacrilamida haciendo el revelado para las enzimas, α y β-esterasas y 3-hidroxibutiratodeshidrogenasa (HBDH) (Selander et al., 1986).

Las bacterias se desarrollaron por duplicado en Medio TY (Tabla 5) contenido en Erlenmeyers de 250 ml de capacidad con 50 ml de medio (esterilizados en autoclave a 121°C durante 20 minutos), en agitador rotatorio de 250 rpm y 2.5 cm de excentricidad, ubicado en cuarto de estufa a 28°C, durante 24 hs.

Tabla 5: Medio TY.

Componentes	Cantidad (g/l)
Extracto de Levadura	3.00
Triptona	5.00
$CaCl_2$	0.87

pH: 7.2

Las suspensiones bacterianas desarrolladas en el medio TY fueron tratadas con el fin de preparar las muestras a las que luego se les practicó la MLEE en gel de poliacrilamida. Aproximadamente 10 ml de las suspensiones se centrifugaron a 10000 rpm a 4°C durante 20 minutos, luego se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió con 1 ml de solución de NaCl al 0.85%. Se recogió en tubos eppendorff y se centrifugó a 15000 rpm durante 10 minutos. Se volcó nuevamente el sobrenadante y se recogió en 0.5 ml de tampón

de extracción (Tabla 6), se centrifugó a 15000 rpm durante 10 minutos y se volvió a descartar el sobrenadante y el precipitado nuevamente se resuspendió en el mismo tampón de extracción con lisozima en concentración de 1 mg/ml, después de incubar 10 minutos a temperatura ambiente se centrifugó 10 minutos a 15000 rpm y se resuspendió el precipitado en tampón de sonicación (Tabla 7), previo descarte del sobrenadante. Se sonicó en seis ciclos de 30 segundos cada uno y por último se centrifugó durante 10 minutos a 15000 rpm reservándose el sobrenadante para la corrida electroforética.

Tabla 6: Tampón de extracción.

Componente	Cantidad
TRIS	1.210 g
$MgCl_2$ $6H_20$	0.101 g
Glicerol	15.00 g
Mercaptoetanol	100 µl
H_2O destilada	100 ml

pH: 7.2 (se lleva con HCl concentrado)

Para preparar el tampón de extracción se agregan los tres primeros componentes con 80 ml de agua destilada y se corrige el pH con $HCl_{(c)}$, luego se agrega el cuarto componente y se completa el volumen a 100 ml con agua destilada.

Tabla 7: Tampón de sonicación.

Componente	Cantidad
TRIS	1.21 g
Glicerol	15.0 g
H_2O destilada	100 ml

pH: 8.8 (se lleva con HCl concentrado)

Las electroforesis se realizaron en placa vertical a voltaje constante (200V) usando gel de poliacrilamida al 5% para el gel concentrador y 10% para el separador (Tabla 8) y utilizando el buffer de corrida especificado en la Tabla 9.

Tabla 8: Composición de geles para placas de electroforesis.

Componente	Gel Concentrador 5%	Gel Separador 10%
TRIS-HCl 2.25 M pH: 8.8	2.00 ml	4.35 ml
Acrilamida-Bis Acrilamida (30:0.8%)	1.33 ml	8.70 ml
Agua destilada	4.62 ml	12.71 ml
Temed	20.00 µl	25.00 µl
Persulfato de amonio	100.00 µl	200.00 µl

Tabla 9: Buffer de corrida.

Componente	Cantidad (g/l)
TRIS	1.5
Glicina	7.1

Figura 18: Cuba electroforética para corrida en placa vertical.

Para el revelado de α y β-esterasas, una vez terminada la corrida, se coloca el gel en tampón fosfato pH: 6.2 (Tabla 10) durante 15 minutos, luego se descarta el tampón y se colorea.

Tabla 10: Tampón fosfato.

Componente	Cantidad (g/l)
K_2HPO_4	1.57
KH_2PO_4	12.38

pH: 6.2

Para colorear, en oscuridad, se disuelven 100 mg de Fast Blue RR en 100 ml de tampón fosfato pH: 6.2 (Tabla 10) agitando y luego se filtra; al filtrado se le agregan los sustratos, 0.06 gr de α-naftilacetato y 0.05 gr de β-naftilacetato previamente disueltos en 0.5 ml de acetona y esta solución se agrega al gel agitando durante 45 minutos para que se produzca la reacción, a continuación detallada, y se desarrolle la coloración de las bandas.

$$\alpha \text{ o } \beta\text{-naftilacetato} \xrightarrow{\alpha \text{ o } \beta\text{-esterasa}} \alpha \text{ o } \beta\text{-naftol} + \text{acetato}$$

$$\alpha \text{ o } \beta\text{-naftol} + \text{Fast Blue RR} \longrightarrow \text{Precipitado coloreado}$$

Por último se lava cuatro o cinco veces con solución decoloradora (Tabla 11) para decolorar el resto del gel y ver más nítidas las bandas y se enjuaga con agua destilada.

Tabla 11: Solución decoloradora.

Componente	Cantidad (ml)
Etanol	150
Ácido Acético	25
H_2O destilada	325

Para revelar 3-hidroxibutiratodeshidrogenasa, una vez terminada la corrida se coloca el gel agitando durante 15 minutos en una solución formada por 50 ml de TRIS A (Tabla 12), 125 mg del sustrato 3-D-hidroxibutirato y 12.5 mg de NAD.

Tabla 12: TRIS A.

Componente	Cantidad
TRIS	2.42 g
EDTA	0.04 g
H_2O destilada	100 ml

pH: 8.0 (se lleva con HCl concentrado)

Transcurridos los 15 minutos se agregan 0.02 g de MTT y 0.02 g de PMS previamente disueltos en 2 ml de agua destilada y se deja reposar 45 minutos para que se desarrolle la coloración de las bandas.

$$\text{3-D-hidroxibutirato + NAD} \xrightarrow{\text{HBDH}} \text{Butirato + NADH}$$

$$\text{NADH + MTT + PMS} \longrightarrow \text{Azul de formazán}$$

Transcurridos los 45 minutos se desecha la solución colorante y se lava varias veces con agua destilada.

Ensayo agronómico en cámara

Para determinar la propiedad de especificidad cepa-cultivar entre las cepas y cultivares de semillas utilizados se llevó a cabo un ensayo en cámara climatizada en condiciones de fotoperíodo y temperatura controladas, de acuerdo a la metodología indicada por Vincent (1970).

Previo a la siembra las semillas fueron esterilizadas colocándolas en un vaso de precipitado con etanol al 95% agitándose durante 30 segundos, luego se sumergieron en NaClO al 5% durante 3 minutos, a continuación se practicaron 5 lavados de aproximadamente 30 segundos cada uno con H_2O destilada estéril en un vaso de precipitado estéril y se pasaron a otro vaso de precipitado estéril que contenía H_2O destilada estéril del cual fueron extraídas con cierta cantidad del agua que las contenía para colocarlas en cajas de Petri con un disco de papel de filtro, también estériles, para germinar a una temperatura de 28°C, en oscuridad.

En el momento en que las semillas desarrollaron 5 mm de radícula, esto fue al cabo de 48 horas, con ayuda de un ansa y en condiciones de esterilidad se sembraron 2 semillas por tubo

(2.5 cm de diámetro por 20 cm de altura) con medio Jensen (Tabla 13), quedando la radícula debajo del agar.

Tabla 13: Medio Jensen.

Componentes	Cantidad (g/l)
$CaHPO_4$	1.0
K_2HPO_4	0.2
$MgSO_4$ $7H_2O$	0.2
NaCl	0.2
$FeCl_3$	0.1
Agar	10.0

pH: 6.5

Los tubos se colocaron en soportes de madera de modo que la superficie del agar coincidiera con el borde del soporte, para proteger a las raíces de la luz. Se utilizó iluminación artificial lateral empleando doble hilera de tubos Grolux por sus emisiones entre 600-700 nm (favorecen la fotosíntesis) y 400-500 nm (favorecen la síntesis de clorofila), recomendado para alfalfa (Figura 19). El fotoperíodo se controló con un reloj automático de manera de tener 16 horas de luz, el rango de temperatura fue de 22-25 °C en condiciones de luz y de 16-19 °C en condiciones de oscuridad.

Figura 19: Ensayo en Cámara Climatizada.

En el ensayo se consideraron los siguientes tratamientos para cada uno de los cuatro cultivares de alfalfa:

1) Testigo sin inocular.
2) Testigo suplementado con nitrógeno (según requerimientos de alfalfa: KNO_3 0.05% incorporados al medio Jensen).
3) Inoculado con la cepa B399.
4) Inoculado con la cepa Lq51.
5) Inoculado con la cepa U143.
6) Inoculado con la cepa A55.

Se realizaron diez repeticiones de cada tratamiento, abarcando el ensayo 240 tubos en total, con dos plantas por tubo. La ubicación en los soportes de madera fue totalmente aleatoria e incluso durante el ensayo se fue rotando. Las inoculaciones fueron realizadas 48 hs después de implantar la semilla en el tubo agregando a cada tubo 1 ml de la suspensión bacteriana, cuya concentración era del orden de 10^9 células viables/ml, desarrollada en el Medio 2 de Tabla 4.

A partir de la segunda semana y hasta la sexta semana de comenzado el ensayo se evaluó cualitativamente la aparición de nódulos en las raíces y el aspecto de las plántulas.

Cuando se observó que el medio comenzaba a separarse de la pared del tubo se comenzó a regar con 1 ml de solución Jensen (Tabla 14) dos veces por semana.

Tabla 14: Solución Jensen.

Componentes	Cantidad (g/l)
$CaHPO_4$	2.500
K_2HPO_4	0.050
$MgSO_4\ 7H_2O$	0.050
NaCl	0.050
$FeCl_3$	0.025

Transcurridas ocho semanas, cuando los testigos sin inocular mostraban signos de senescencia en sus hojas, se separó parte aérea de raíz, y se secaron ambas partes por separado en estufa con circulación de aire a 60°C hasta peso constante a fin de determinar materia seca y sobre

estos datos se realizó un análisis estadístico para verificar si los resultados obtenidos para los distintos tratamientos presentaban diferencias significativas entre sí.

Una vez determinada materia seca, a partir de los datos de peso seco y utilizando la fórmula que a continuación se detalla se determinó el índice de eficiencia relativa (I. E. R.).

$$\text{I. E. R.} = \frac{\text{peso seco del tratamiento inoculado} - \text{peso seco del testigo}}{\text{peso seco del testigo nitrogenado} - \text{peso seco del testigo}} \times 100$$

Luego, las muestras correspondientes a materia seca de parte aérea se molieron y se determinó porcentaje de nitrógeno y proteínas por el método de Kjeldahl utilizando un equipo Tecator, Kjeltec Auto 1030 Analizer.

La primer etapa en el método de Kjeldahl consiste en una digestión ácida para ello se colocan 100 mg de la muestra molida y 1.25 g de catalizador (Tabla 15) en un sobre, el cual se introduce en un tubo de cuello largo para evitar pérdida de muestra por salpicadura. Se agregan 2.5 ml de ácido sulfúrico concentrado al tubo y luego se calienta. De esta manera el sólido se digiere (se descompone y disuelve) en el ácido sulfúrico a ebullición, que convierte el nitrógeno presente en la muestra en ión amonio y oxida a los demás elementos presentes.

Tabla 15: Catalizador.

Componente	Cantidad (g)
K_2SO_4 anhidro *	24.0
HgO *	1.0

*(Se muelen con mortero hasta obtener una mezcla fina y uniforme)

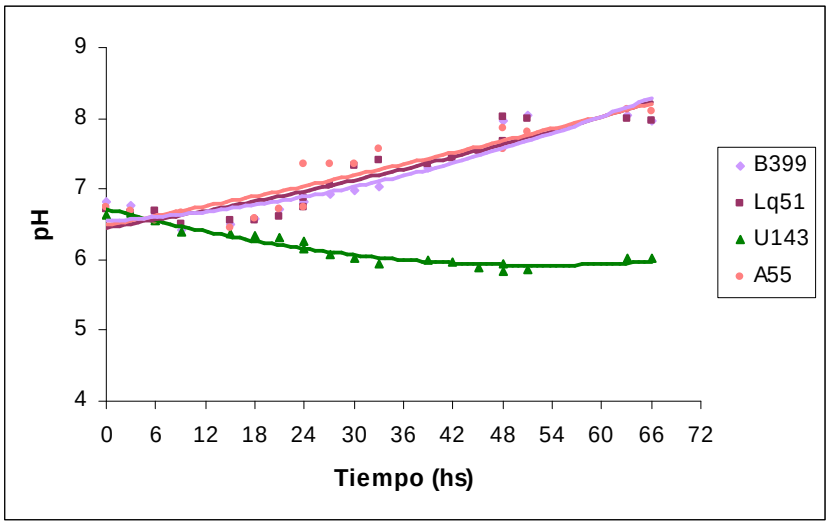
En la segunda etapa del método, la destilación y titulación es realizada automáticamente en el equipo Tekator antes nombrado. En la misma se alcaliniza el producto de digestión con una solución de hidróxido de sodio al 40% y 60 g de tiosulfato de sodio por litro de álcali, luego el amoníaco producido es arrastrado por una corriente de vapor y reacciona con ácido bórico al 1% produciéndose metaborato el cual es luego titulado con ácido clorhídrico utilizando un indicador mixto formado por verde de bromocresol y rojo de metilo. A partir del volumen de ácido clorhídrico gastado que proporciona el equipo se calcula el porcentaje de nitrógeno y proteína de la muestra.

Resultados y Discusión

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *SINORHIZOBIUM MELILOTI*

Estudio del crecimiento celular de cepas de *Sinorhizobium meliloti* en medios de cultivo líquido

En la Figura 20 se representa la evolución del pH y el crecimiento celular expresado en UDO (unidades de densidad óptica), de las cepas Lq51, B399, U143 y A55 durante 66 horas de desarrollo de proceso.



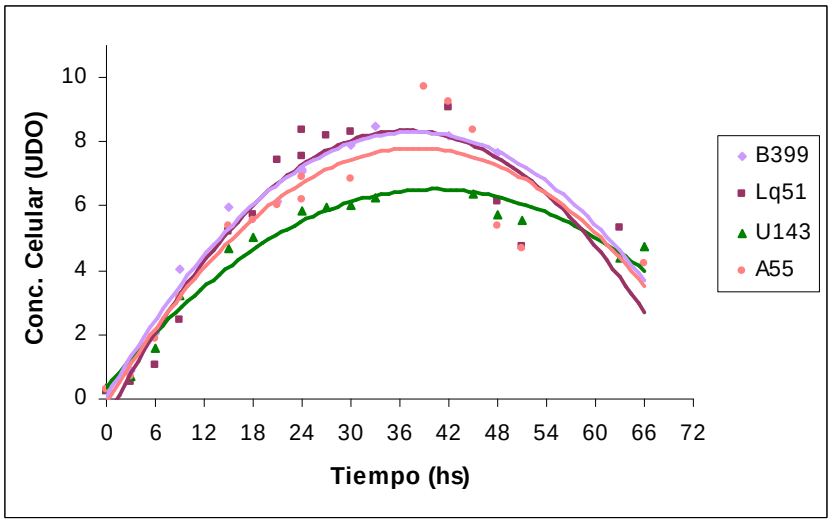


Figura 20: Evolución del pH y de la UDO de la cepa Lq51.

Se puede observar un aumento del pH hasta valores cercanos a 8.0 para las cepas Lq51, B399 y A55 y una disminución hasta valores de 6.0 para la cepa U143, variaciones que no afectan el desarrollo microbiano, el cual alcanzó aproximadamente a las 36 horas para las cepas Lq51, B399 y A55 un valor máximo entre 7.5 y 8.5 UDO y para la cepa U143 aproximadamente a las 40 horas un valor de 6.0 UDO. El descenso del pH en el desarrollo de la cepa U143 explica el menor crecimiento celular y el mayor tiempo que tardó en alcanzar su máxima concentración celular, congruente con las condiciones de operación llevadas a cabo. En todos los casos el desarrollo celular alcanzó valores aceptables para procesos biotecnológicos. En paralelo a estas mediciones se realizaron observaciones microscópicas descartándose la posibilidad de la existencia de contaminantes.

A partir de las curvas de crecimiento se calculó para cada cepa la velocidad específica de crecimiento (μ) y el tiempo de generación (tg), los cuales se indican en la Tabla 16.

Tabla 16: Velocidad específica de crecimiento y tiempo de generación de las cuatro cepas en estudio.

Cepa	**μ (hs^{-1})**	**tg (hs)**
Lq51	0.261	2 hs 40 min
B399	0.254	2 hs 44 min
U143	0.246	2 hs 49 min
A55	0.252	2 hs 45 min

Se puede observar que los valores de μ y tg se corresponden con los valores alcanzados por la biomasa mostrados en la Figura 20.

Electroforesis de isoenzimas

La Figura 21 muestra el gel de poliacrilamida donde se observa el perfil de enzimas metabólicas para α y β-esterasas de las cepas en estudio, donde las bandas marrones corresponden al precipitado de α-naftol y las moradas al de β-naftol.

El análisis de los perfiles de α y β-esterasas muestra diferencias en la expresión genética de las cepas Lq51, B399 y U143 y A55; pero característica del género *Sinorhizobium*.

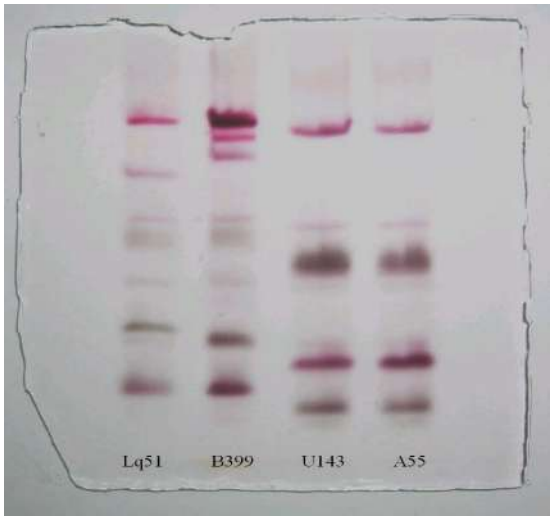


Figura 21: Perfiles de enzimas metabólicas de α y β esterasas de las cepas en estudio.

Entre las cepas U143 y A55 el polimorfismo para α y β-esterasas es el mismo lo que indicaría que podrían ser una misma cepa o tener una cercanía genética mayor que con las otras cepas en estudio. En el caso de las cepas Lq51 y B399 si bien los perfiles isoenzimáticos revelados para α y β-esterasas son diferentes se observa coincidencia en varias bandas lo que indicaría que se encuentran muy cercanas genéticamente.

En la Figura 22 se observa el perfil de 3-hidroxibutiratodeshidrogenasa (HBDH) de las cepas en estudio.

Figura 22: Perfiles isoenzimáticos de HBDH de las cepas en estudio.

En la Figura 22 se pueden observar las bandas azules correspondientes al precipitado de azul de formazán consecuente de la actividad de la HBDH, también debido a esta actividad pueden observarse las bandas translúcidas de oxidasas que se producen por una reacción desarrollada en paralelo.

El análisis de los perfiles de HBDH y oxidasas de las cepas estudiadas muestran una expresión genética característica del género *Sinorhizobium*. Entre las cepas U143 y A55 los perfiles isoenzimáticos, como en el caso de α y β-esterasas, son iguales, los que apoya la posibilidad de que fueran una misma cepa o tuvieren una cercanía genética mayor que las otras cepas en estudio. En el caso de las cepas Lq51 y B399 el perfil de bandas revelado para HBDH y oxidasas es el mismo, lo que respalda la idea de que se encuentran muy cercanas genéticamente.

La Figura 23 muestra el dendrograma construido por el método UPMGA (utilizando el sistema NTSYS-pc) que indica la relación entre las cepas en estudio respecto a sus perfiles de α y β-esterasas, HBDH y oxidasas.

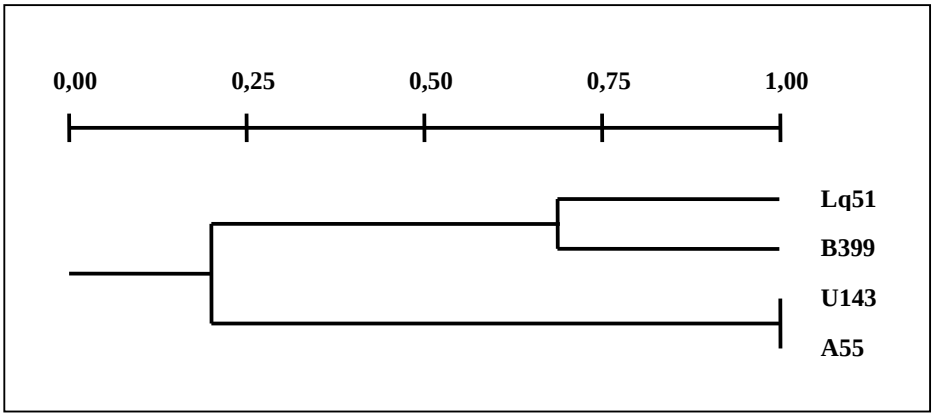


Figura 23: Dendrograma de las cepas en estudio
en función de sus perfiles de α y β-esterasas, HBDH y oxidasas.

El análisis del dendrograma realizado para las enzimas de α y β-esterasas, HBDH y oxidasas muestra que entre las cepas Lq51 y B399 hay una similitud genética del 69% mientras que para las cepas U143 y A55 la misma es del 100%.

INTERACCIÓN PLANTA-MICROORGANISMO: ENSAYO EN CÁMARA CLIMATIZADA

Ensayo en cámara climatizada - Determinaciones cualitativas

A las dos semanas de iniciado el ensayo en cámara climatizada el desarrollo de las plantas fue observado cualitativamente registrándose crecimiento y nodulación de las mismas. Los ensayos con las semillas utilizadas en Chile y Argentina mostraban en general un crecimiento similar en los tratamientos inoculados, mayor al testigo, predominando una coloración verde más oscura en los inoculados con la cepa B399; en los tratamientos suplementados con nitrógeno todavía no se podía observar respuesta y en cuanto a los testigos, como era de esperarse el desarrollo era menor y la coloración verde más claro. En la semilla de origen uruguayo el crecimiento para todos los tratamientos era similar al testigo, en este lapso de tiempo todavía no se podía observar respuesta a las inoculaciones con las cepas o al suplemento de nitrógeno. Comparación que se puede observar en la Figura 24.

En cuanto a la nodulación, en el caso de las semillas utilizadas en Argentina los tratamientos inoculados presentaban en un 80% de los casos nodulación, sin observarse diferencias entre las distintas cepas inoculadas; la semilla utilizada en Chile mostraba una nodulación del 50% de los tratamientos inoculados y con respecto a la semilla proveniente de Uruguay, la nodulación era prácticamente nula, observándose algunos nódulos en los tratamientos inoculados con las cepas Lq51 y A55 únicamente. Como era esperado, los tratamientos suplementados con nitrógeno y los testigos no presentaban nodulación.

Figura 24: Tratamientos de las semillas Sequel (izquierda) y Chaná (derecha), transcurridos los veinte días de ensayo.

Transcurrido el mes de ensayo en cámara climatizada, nuevamente, se observó crecimiento y nodulación. A esta altura del ensayo el crecimiento de los tratamientos inoculados y suplementados con nitrógeno se fue igualando para las semillas usadas en Chile y en Argentina, pudiéndose observar una respuesta más marcada en los tratamientos inoculados con la cepa B399; mientras que los tratamientos testigos mantuvieron un tamaño pequeño y coloración verde más claro. La semilla uruguaya, en los tratamientos inoculados, aumento en cierta medida su altura pero presentó escasa cantidad de hojas y coloración verde clara.

En cuanto a la nodulación a esta altura del ensayo el 100% de los tratamientos inoculados presentaron nodulación, pero en el caso de la semilla originaria de Uruguay la cantidad de nódulos fue visiblemente menor que la presente en las otras semillas usadas.

Transcurridas las 8 semanas de ensayo, cuando las plantas del tratamiento testigo presentaban senescencia, se procedió al descalce de las plantas, momento en el cual también se realizó un análisis cualitativo registrándose crecimiento y nodulación, en el mismo se pudo observar que se mantenía el patrón observado al mes de ensayo con una evidente mejora en la nodulación de la semilla uruguaya. Detalles de ésta observación se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17: Análisis cualitativo transcurridas las 8 semanas de ensayo.

Semilla	Tratamiento	Crecimiento	Nódulos	Ubicación predominante de nódulos
Ecotipo Pampeano	B399	Alto	• Grandes • Rosados • Abundantes	Raíz primaria
	Lq51	Alto	• Grandes • Rosados • Abundantes	Raíz secundaria
	A55	Medio- Alto	• Pequeños • Rosados	Raíz primaria
	U143	Medio- Alto	• Pequeños • Rosados • Escasos	Cercanos a raíz primaria
	Nitrogenado	Alto	Ausencia	
	Testigo *	Bajo	Ausencia	

Chilena	B399	Alto	• Medios • Rosados • Escaso	Cercanos a raíz primaria
	Lq51	Medio- Alto	• Medios • Rosados • Abundantes	Raíz primaria y secundaria
	A55	Alto	• Pequeños • Rosados • Abundantes	Raíz primaria y secundaria
	U143	Alto	• Grandes • Rosados • Abundantes	Cercanos a raíz primaria
	Nitrogenado	Alto	Ausencia	
	Testigo *	Bajo	Ausencia	
Sequel	B399	Alto	• Pequeños • Rosados	Raíz secundaria
	Lq51	Alto	• Grandes • Rosados	Cercanos a raíz primaria
	A55	Alto	• Rosados	Raíz secundaria
	U143	Alto	• Grandes • Rosados	Raíz secundaria
	Nitrogenado	Alto	Ausencia	
	Testigo *	Bajo	Ausencia	

Chaná **	B399	Medio- Bajo	• Medios • Marrones • Escasos	Raíz secundaria
	Lq51	Medio-Bajo	• Grandes • Marrones • Escasos	Raíz primaria
	A55	Medio-Bajo	• Grandes • Rosados • Abundantes	Raíz primaria
	U143	Medio- Bajo	• Grandes • Rosados • Abundantes	Cercanos a raíz primaria
	Nitrogenado	Bajo	Ausencia	
	Testigo *	Bajo	Ausencia	

* Coloración amarillenta de parte aérea.

** Coloración marrón de raíces y verde amarillenta de parte aérea.

En las Figuras 25 y 26 puede observarse el crecimiento de los distintos tratamientos al finalizar el ensayo en cámara.

Figura 25: Tratamientos de las semillas Ecotipo Pampeano (izquierda) y chilena (derecha) transcurridas las 8 semanas de duración del ensayo en cámara climatizada.

Figura 26: Tratamientos de las semillas Sequel (izquierda) y Chaná (derecha), transcurridas las 8 semanas de duración del ensayo en cámara climatizada.

En la Figura 27 se ve la nodulación que caracterizó a alguno de los tratamientos inoculados con las distintas cepas llevado a cabo en la cámara.

Figura 27: Nódulos grandes y rosados (izquierda) ubicados en raíz primaria y secundaria (derecha), presentes en los tratamientos inoculados.

Determinación del peso seco de parte aérea y raíz

A las 8 semanas de implantado el ensayo en la cámara climatizada, se descalzaron las plantas de los tubos separando la parte aérea de la raíz, ambas partes se colocaron en estufa con circulación de aire a una temperatura de 60°C a fin de determinar su peso seco (PS).

A partir de este punto sólo se trabajó con la parte aérea debido a que en el desarrollo de las raíces de los distintos tratamientos no se evidenció diferencias.

A los valores de peso seco obtenidos se les aplicó un análisis estadístico realizándoles un test no paramétrico (dado que los datos obtenidos del ensayo en cámara no tenían una distribución normal), la Prueba de Kruskal Wallis, para cada uno de las semillas utilizadas comparando de a pares.

En la Tabla 18 se muestran los valores de peso seco obtenidos de los tratamientos desarrollados en cámara climatizada y el resultado del análisis estadístico, en el cual letras distintas indican diferencias significativas para $p <= 0.05$.

Tabla 18: Peso seco aéreo promedio por planta de cada tratamiento en cámara climatizada.

Tratamiento	PS Aéreo promedio por planta (g)
Ecotipo Pampeano + B399	0.04237 (c)
Ecotipo Pampeano + Lq51	0.02744 (b)
Ecotipo Pampeano + U143	0.02749 (b)
Ecotipo Pampeano + A55	0.02542 (b)
Ecotipo Pampeano + N	0.04882 (c)
Ecotipo Pampeano T	0.00828 (a)
Sequel + B399	0.03399 (b)
Sequel +Lq51	0.04165 (b)
Sequel + U143	0.04038 (b)
Sequel + A55	0.03499 (b)
Sequel + N	0.04630 (b)
Sequel T	0.01284 (a)

Chilena + B399	0.05299 (b)
Chilena + Lq51	0.05205 (b)
Chilena + U143	0.04985 (b)
Chilena + A55	0.03996 (b)
Chilena + N	0.03803 (b)
Chilena + T	0.00872 (a)
Chaná + B399	0.02127 (ab)
Chaná + Lq51	0.03720 (b)
Chaná + U143	0.03650 (b)
Chaná + A55	0.03017 (b)
Chaná + N	0.03765 (b)
Chaná T	0.00910 (a)

Al analizar la Tabla 18 puede verse un similar desarrollo aéreo de las plantas inoculadas y las suplementadas con nitrógeno para los tratamientos de las semillas Sequel, chilena y Chaná; puede observarse, también, en el caso de la semilla Ecotipo Pampeano un peso seco superior con la inoculación de la cepa B399 frente a las restantes cepas. En todos los casos se nota un menor desarrollo aéreo, según lo esperado, de los testigos frente a los tratamientos inoculados y suplementados con nitrógeno. Estos resultados son avalados por el análisis estadístico el cual evidencia diferencias significativas de los tratamientos inoculados y suplementados con nitrógeno frente a los testigos para los ensayos de todas las semillas en estudio, salvo una única excepción del tratamiento inoculado con la cepa B399 de la semilla Chaná que no mostró diferencias significativas con ninguno de los demás tratamientos de dicha semilla; además, en el único caso en que se observa diferencia significativa de algún tratamiento inoculado es en el caso de la semilla Ecotipo Pampeano, en el cual el tratamiento inoculado con B399 muestra diferencia significativa sobre el resto de los tratamientos inoculados de la misma semilla y sin diferencia significativa al tratamiento suplementado con nitrógeno.

Este análisis se ve resumido en la Figura 28.

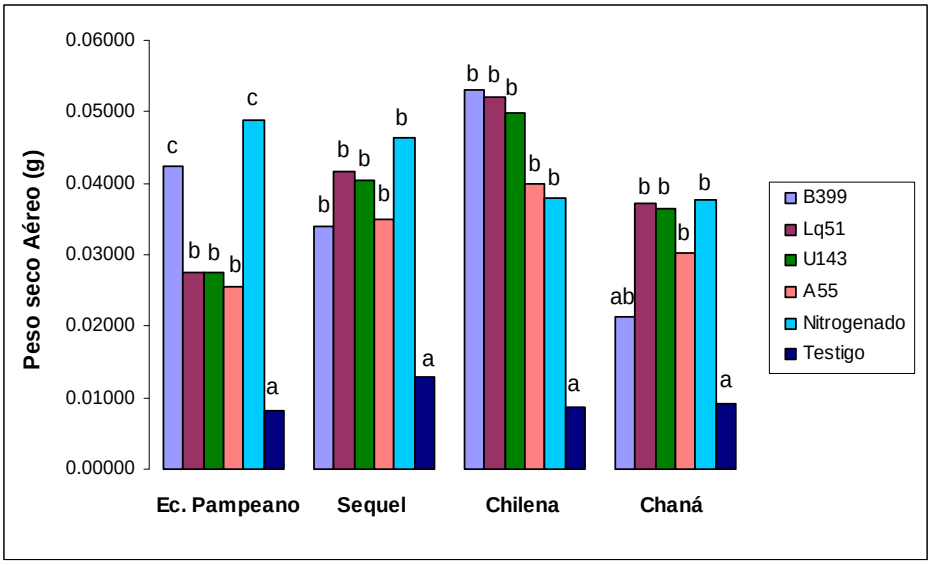


Figura 28: Peso seco aéreo de las plantas desarrolladas en el ensayo en cámara climatizada.

También es posible visualizar estos resultados como el porcentaje de respuesta, tomando como respuesta el aumento de peso seco de los tratamientos inoculados frente al tratamiento sin ningún tipo de suplementación, es decir frente al tratamiento testigo (Tabla 19).

Tabla 19: Porcentaje de respuesta de los tratamientos inoculados frente al testigo.

Tratamiento	% Respuesta Aérea
Ecotipo Pampeano + B399	411.71
Ecotipo Pampeano + Lq51	231.40
Ecotipo Pampeano + U143	232.00
Ecotipo Pampeano + A55	207.01
Sequel + B399	164.72
Sequel + Lq51	224.38
Sequel + U143	214.49
Sequel + A55	172.51

Chilena + B399	507.68
Chilena + Lq51	496.90
Chilena + U143	471.67
Chilena + A55	358.26
Chaná + B399	133.74
Chaná + Lq51	308.79
Chaná + U143	301.10
Chaná + A55	231.54

De la Tabla 19 se desprenden las mismas conclusiones que observando el valor de peso seco y se puede agregar que en general las inoculaciones de la semilla chilena son las que más respuesta obtuvieron, en el resto de las semillas la respuesta fue similar, lo que evidenciaría que está influyendo en la FBN un factor biótico que ya no solo es la cepa sino también la semilla. Este análisis puede verse graficado en la Figura 29.

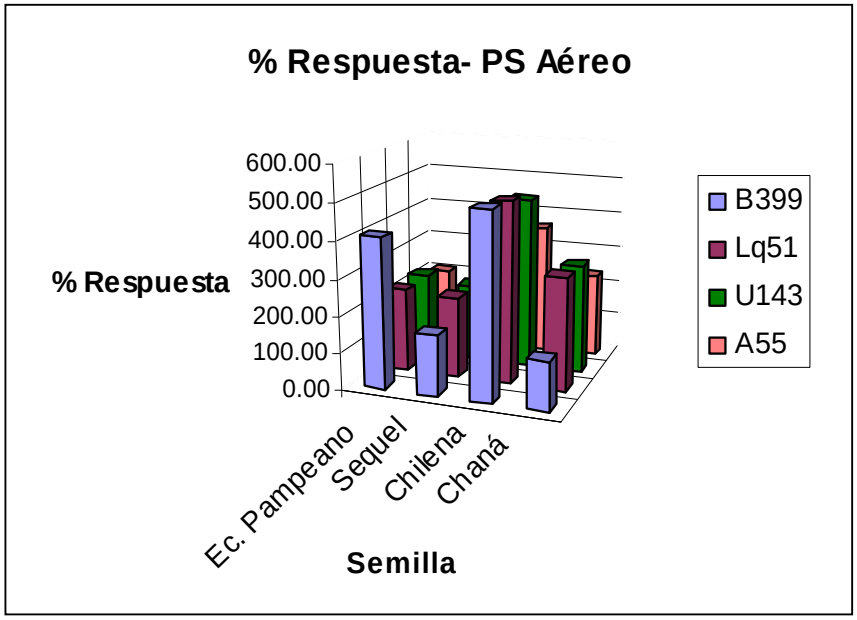


Figura 29: Porcentaje de respuesta, como aumento de peso seco aéreo, de los tratamientos inoculados frente al testigo.

Determinación del Índice de Eficiencia Relativa (I.E.R.)

Los valores del I. E. R. obtenidos a partir de la ecuación detallada anteriormente en Materiales y Métodos se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20: Valores de los I. E. R. de los tratamientos realizados en cámara climatizada.

Tratamiento	I. E. R.
Ecotipo Pampeano + B399	84.08%
Ecotipo Pampeano + Lq51	47.27%
Ecotipo Pampeano + U143	47.40%
Ecotipo Pampeano + A55	42.28%
Sequel + B399	63.22%
Sequel + Lq51	86.12%
Sequel + U143	85.30%
Sequel + A55	66.21%
Chilena + B399	151.06%
Chilena + Lq51	147.84%
Chilena + U143	140.33%
Chilena + A55	106.58%
Chaná + B399	42.63%
Chaná + Lq51	98.42%
Chaná + U143	95.97%
Chaná + A55	73.80%

El cálculo del I. E. R. apoya las conclusiones sacadas con el peso seco dado que la eficiencia en la inoculación de la cepa B399 es mayor frente a las restantes cepas en el caso de la semilla Ecotipo Pampeano. Además, puede observarse que el factor biótico, la semilla, intervendría en la eficiencia de la fijación, como ya lo había indicado el porcentaje de respuesta, dado que los I. E. R. para la semilla chilena tuvieron en general valores mayores entre 100 y 150%, los

de las semillas Sequel y Chaná valores medios entre 60 y 85% y por último los de Ecotipo Pampeano con valores más bajos situados entre 40 y 85%.

Determinación del contenido de nitrógeno

En la Tabla 21 se indican los valores de contenido de nitrógeno de los distintos tratamientos inoculados con las cepas en estudio, los cuales se representan en la Figura 30.

Tabla 21: Contenido de nitrógeno de los distintos tratamientos inoculados con las cepas en estudio.

Tratamiento	% Nitrógeno promedio
Ecotipo Pampeano + B399	2.891
Ecotipo Pampeano + Lq51	2.671
Ecotipo Pampeano + U143	2.697
Ecotipo Pampeano + A55	2.980
Sequel + B399	3.159
Sequel +Lq51	2.496
Sequel + U143	2.269
Sequel + A55	2.923
Chilena + B399	2.802
Chilena + Lq51	2.994
Chilena + U143	3.050
Chilena + A55	3.114
Chaná + B399	1.622
Chaná + Lq51	1.584
Chaná + U143	1.595
Chaná + A55	1.318

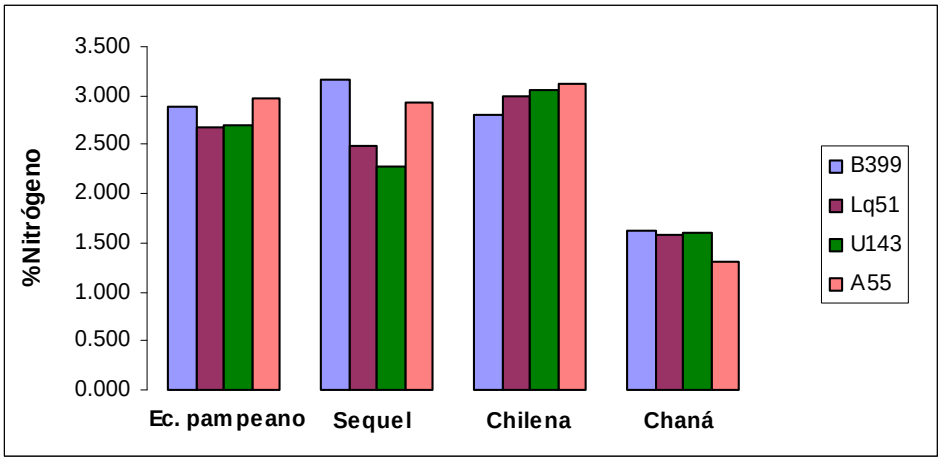


Figura 30: Porcentaje promedio de nitrógeno de los tratamientos llevados a cabo en el ensayo en cámara climatizada.

En el porcentaje de nitrógeno de los distintos tratamientos inoculados no se observan diferencias, lo que está indicando cierta correspondencia con el análisis realizado a partir de los valores de peso seco, aunque se hubiera esperado encontrar alguna diferencia en los valores de porcentaje de nitrógeno de la semilla Ecotipo Pampeano en la inoculación con la cepa B399 respecto a las restantes cepas en estudio.

El bajo porcentaje de nitrógeno de los tratamientos inoculados de la semilla Chaná, ya sospechado en el análisis cualitativo debido a la coloración verde más clara de los mismos, evidenciaría nuevamente la influencia del biotipo, semilla, pero en este caso, al contrario de la semilla chilena, marcando una deficiencia en las propiedades simbióticas respecto a las otras semillas.

Conclusiones

La caracterización de las cepas utilizadas permitió:

- Observar una similitud genética del 69% entre las cepas Lq51 y B399 (determinada por el método UPMGA utilizando perfiles de α y β-esterasas, oxidasas y HBDH).

- Observar una similitud del 100% entre las cepas U143 y A55 (determinada por el método UPMGA utilizando perfiles de α y β-esterasas, oxidasas y HBDH), lo que nos estaría indicando que podrían ser la misma cepa. Para confirmar este resultado deberían realizarse estudios con otras enzimas o bien aplicarse técnicas moleculares.

Del ensayo en cámara climatizada podemos concluir:

- La semilla Ecotipo Pampeano tiene mejor respuesta en cuanto a peso seco, % de respuesta aérea frente al testigo e I. E. R., al ser inoculada con la cepa B399 lo que verifica la hipótesis y objetivo planteado.

- La semilla Sequel si bien no muestra diferencias significativas entre los tratamientos con las distintas cepas respecto a peso seco, sí se observa una producción mayor de materia seca y un % de respuesta aérea frente al testigo e I. E. R. mayor al ser inoculada con la cepa Lq51, lo que también verifica la hipótesis y objetivo planteado.

- Con la semilla de origen chileno no hay diferencias significativas entre los tratamientos, los resultados muestran una alta respuesta a la inoculación con todas las cepas utilizadas aunque se puede observar mejor respuesta a la inoculación con B399 y Lq51. Este resultado podría estar influenciado positivamente por algún factor biótico correspondiente a la semilla.

- Respecto a la semilla de origen uruguayo si bien no existen diferencias significativas entre los tratamientos, la misma tiene buena respuesta a la cepa comercial utilizada en el país de origen pero también presenta buena respuesta al ser inoculada con la cepa Lq51, aunque en todos los casos el rendimiento es bajo, hecho que también se puede atribuir al biotipo de semilla utilizado.

Bibliografía

Andrews, R. W.; Peters, S. E.; Janke, R. R. and Sahs, W. E. (1992). Converting to sustainable farming systems. In: Francis, Ch. A., Flora, C: B: y King, L. D. (Ed.). Sustainable Agricultura in Temperate Zones. John Wiley & Sons, New Cork, USA. P. 281-438.

Antoun, H. et al. (1998). Plant and Soil. 204:57-67.

Aragón, J. R. et al. (1986). Investigación, tecnología y producción de alfalfa. Colección científica, tomo XXII.

Aragón, J. R. et al. (1995). La alfalfa en la Argentina. INTA.

Azcón-Bieto F. and Talón M. (2000). Fundamentos de fisiología vegetal. Mc. Graw-Hill. 16: 247-260.

Ballati, A. P. and Freire, J. (1996). "Legume Inoculants. Selection and characterization of strains. Production, use and management". Ed. Kinggraf. La Plata, Argentina. p. 148.

Bashan, Y. and Levanony, H. (1990). Current status of *Azospirillum* inoculation technology. Azospirillum as a challenge for agriculture. Can. J. Microbiol. 36:591-608.

Bedmar, E. J. et al., 1992. Interacción Planta-Microorganismo: Biología del Nitrógeno. Ed. coordinada: Gonzáles López, J. y Lluch Pla, C. Ed. Rueda, S. L., Madrid. p. 27, 100.

Berger, M. E.; Len, R. J. and Fenoglio, H. F. (1985). Cambios en la concentración de elementos minerales en alfalfa con el avance a madurez. Rev. Arg. Animal 5(3-4): 149-155.

Berger, M. E.; Len, R. J. and Fenoglio, H. F. (1986). Cambios en la digestibilidad in vitro, proteína bruta y materia seca de dos cultivares de alfalfa con el avance a madurez. Rev. Arg. Animal 6(7-8): 423-427.

Bergensen, F. J. (1971). Biochemistry of symbiotic nitrogen fixation in legumes. Annual Review of Plant Physiology 22: 121-140.

Bhuvaneswari, T. V.; Turgeon, B.G. and Bauer, W.D. (1980). Early events in the infection of soybean (*Glycine max* L. Merr) by *Rhizobium japonicum.* I. Localization of infectible root cells. Plant Physiol. 66: 1027-1031.

Bohlool, B. B. and Schmidt, E.L. (1974). Lectins: a possible basis for specificity in the *Rhizobium*-legume root nodule symbiosis. Science. 185: 269-271.

Bolton, J. L. et al. (1972). World distribution and historical development. In Hanson, C. H. ed. Alfalfa Science and Technology. Madison, Wisconsin, American Society of Agronomy. pp. 1-34.

Bonel, J. A. et al. (1979). Influencia de la alfalfa sobre la fertilidad nitrogenada del suelo en la pampa húmeda. Marco Juarez, Est. Exp. Reg. Agrop. Hoja Informativa N° 38. 4 p.

Brockwell, J. and Hely, F. W. (1961). Aust. J. Agr. Res. 12: 630-643.

Brockwell, J. and Hely, F. W. (1966). Aust. J. Agr. Res. 17: 885-899.

Burton, J. C. and Wilson, P. W. (1939). Soil Scl. 47:293-303.

Burton, J. C. and Erdman, L. W. (1940). J. Amer. Soc. Agron. 32: 439-450.

Burton, J. C. (1972). Nodulation and symbiotic nitrogen fixation. Alafalfa Science and Technology. Madison , Wisconsin, American Society of Agronomy. pp 229-246; 291-292.

Caetano Anollés, G.; Crist Estes, D. K. and Bauer, W.D. (1988). Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. J. Bacteriol. 170: 3164-3169.

Chabot, R. et al. (1996). Plant Soil 184: 311-321.

Chen, W. X.; Yan, G. H. and Li, J. L. (1988). Numeric Taxonomic study of the fase-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. Nov. Int. J. Syst. Bacterial., 38:392-397.

Conrad, H. R. and Martz, F. A. (1985). Forages for dairy cattle. p. 550-559.

Culot, J. P. (1986). Nutrición mineral y fertilización en el ambiente de la región pampeana. In*:* Investigación, tecnología y producción de alfalfa. INTA. Buenos Aires. (Argentina).

De Lajudie, P.; Willems, A.; Pot, B. et al. (1994). Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. Nov., *Sinorhizobium saheli* sp. Nov., and *Sinorhizobium terangae* sp. Nov. Int. J. Syst. Bacterial. 44:715-733.

Del Papa, F.; Postorio, M.; Draghi, N. O.; Balagué, L. I.; Perticari, A. and Lagares, A. (2003). Condiciones ambientales al desarrollo de la simbiosis Rizobio-Leguminosa. En Microbiología Agrícola: Un aporte de la Investigación Argentina. Ed. por UNSE. pp.195-210.

Dénarié, J. and Cullimore, J. (1993). Lipo-oligosaccharide nodulation factors: a new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. Cell 74: 951-954.

Downie, J. A. (1998). Functions of nodulation genes. H.P. Spaink, A. Kondorosi y P.J.J. Hooykaas (eds.). En: The *Rhizobiaceae*. Molecular biology of model plant-associated bacteria. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 387-402.

Erdman, L. W. and Ura Mae Means (1953). Agron. J. 45: 625-629.

Fahraeus, G. and Ljunggren, H. (1968). Preinfection phases of the legume simbiosis. The Ecology of Soil Bacteria. Liverpool Univ. Press. pp. 396-421.

Favelukes, G.; Lodeiro, A.; Wall, L. G. and Lagares, A. (1996). Intercambios de reconocimiento entre la leguminosa y los rizobios, y fenómenos de competición en las etapas tempranas de la asociación simbiótica. En: XVIII RELAR-Análisis de la interacción entre microorganismos y plantas. p. 1-8.

Fischer, H. M. (1994). Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. Microbiol. Rev. 58: 352-386

Foucher, F. and Kondorosi, E. (2000). Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. Plant Mol Biol. 43: 773-786.

Fraysse, N.; Couderc, F. and Poinsot, V. (2003). Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*-legume symbiosis. Eur. J. Biochem. 270: 1365-1380.

Freire, J. R. J. (1992). Fixacao do nitrogeni pela simbiose Rizóbio/Leguminosas. In: Sociedade Brasileira de Ciencias do Solo. Microbiologia do Solo. p. 1-360, Campinas, SP.

Frioni, L. (1999). Procesos microbianos. Colección manuales. Ed. De la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto, Argentina. Vol. I y II.

Garrity, G. M. and Holt, J. G. (2001). The road map to the manual. En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2 nd edición. Volume I. Boone, D. R., Castenholz, R. W. y Garrity, G. M. (eds.). pp. 119-166

Gaworzewska, E. T. and Carlile, M. J. (1982). Positive chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants. J. Gen. Microbiol. 128: 1179-1188.

Gibson, A. H. (1962). Aust. J. Agr. Res. 13: 388-389.

Giller, J. E.; McDonagh, J. F. and Cadisch, G. (1994). Can biological nitrogen fixation sustain agriculture in the tropics. En: Soil Science and Sustainable Land Mangagement in the Tropics. (J. K. Syers and Rimmer, D. L., eds.). CAB International, Wallingford.

Giller, K. E. and Vargas, E. (1996). Leguminosas tropicales: proveedores y pilladores de nitrógeno. *In:* Memorias XVIII Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. P. 19-29.

Gillis, M.; Bañadme, P.; De Vos, P.; Swings, J. and Kersters, K. (2001). Polyphasic Taxonomy. Pp. 43-48. En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2 nd edición. Volume I. Boone, D. R., Castenholz, R. W. y Garrity, G. M. (eds.)

Grassano, A. (1990). Factores abióticos que afectan la nodulación e influyen en la sobrevivencia de las cepas de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Monografía presentada en el curso de postgrado sobre Biología de suelo dictado en la Facultad de Agronomía del Sur.

Grassano, A.; Ronchi, A. L.; Balatti, A. P. and Scarone, J. G. (2002). "Caracterización de cepas nativas de *Sinorhizobium melilloti* y su evolución en el cultivo de alfalfa". Agrochimica. Vol. XLVI; pp. 1-9. Pisa, Italia.

Hablieb, C. M. and Luden, P. W. (2000). Regulation of biological nitrogen fixation. J. Nutr. 130: 1081-1084.

Hoyt, P. B. and Henning, A. M. F. (1971). Effect of alfalfa and grasses on yield of subsequent wheat crops and some chemical properties of a gray soil. Canadian Journal of Soil Science 51 (2): 177-183.

Jjemba, P. K. (2001). The interaction of protozoa with their potential prey bacteria in the rhizosphere. J. Eukaryot. Microbiol. 48: 320-324.

Keel, C. et al. (1992). Mol. Plant-Molecular Interact. 5:4-13.

Kiesselbach, T. A.; Russely, J. A. and Anderson, J. A. (1929). The significance of subsoil moisture in alfalfa production. Journal of the American Society of Agronomy 21(3): 241-268.

Kijne, J.W.; Bauchrowitz, M. A. and Díaz, C. L. (1997). Root lectins and rhizobia. Plant Physiol. 115: 869-873.

King, L. D. (1992). Sustainable soil fertility practices. In: Francis, C. A.; Flora, C. B. and King, L. D. (Ed.). Sustainable Agriculture in Temperate Zones. John Wiley & Sons, New York, USA, p. 144-177.

Kloepper, J. W. (1996). Bio Science 46:406-409.

Kluepfel, D. A. (1993). The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere. Ann. Rev. Phytopatol. 31: 441-472.

Koepf, H. H.; Pettersson, B. D. and Schaumann, W. (1976). Biodynamic Agricultura: An introduction. Anthroposophic Press. Spring Valley. N. Y. USA.

Lagares, A. (1989). La asociación simbiótica rizobio-leguminosa: componentes superficiales bacterianos involucrados en las etapas tempranas. Tesis Docoral. Universidad Nacionel de La Plata. La Plata, Argentina.

Lagares, A. and Favelukes, G. (1990). *Rhizobium meliloti* LPS saccharide moiety involved in early simbiotyc recognition by alfalfa. En Gresshoff, P. M.; Roth, L. E.; Stacey, G. and Newton; W. E. (eds.). 1990. Nitrogen Fixation: Archivements and Objectives. Chapman and Hall, New York and London. p. 256.

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. Cap. 14. Microbioloía Agrícola. Un aporte a la investigación argentina. Argentina. Ed. Ada Albanessi y col. UNSE. p. 275.

Long, S. R. (1989). *Rhizobium*-legume nodulation: life together in the underground. Cell 56: 203-214.

Lynch, J. M. (1990). The Rhizosphere. Jonh Wiley and Sons, New York. p. 458.

Lyon, T. L. and Buckman, H. O. (1952). La materia orgánica en los suelos minerales. Edafología; naturaleza y propiedades del suelo. Buenos Aires, Acme Agency. pp. 111-137.

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

Marek Kozaczuk, M.; Kopcinska, J.; Lotocka, B.; Golinowski, W. and Skorupska, A. (2000). Infection of clover by plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* strain 267

and *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* studied by mTn5-gusA. Antonie Van Leeuwenhoek. 78: 1-11.

McKey, D. (1994). Legumes and nitrogen: The evolutionary ecology of a nitrogen demanding lifestyle. In: Advances in Legume Sistematics 5: the Nitrogen Factor (J. I. Sprent and McKey, D., eds.), Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 21-228.

Natera, S. H. A.; Guerreiro, N. and Djordjevic, M. (2000). Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. Mol. Plant-Microbe Interact.13: 995-1009.

Nieto, K. and Frakerberger, W. (1989). Soil Sci. Soc. Am. J. 53:735-740.

Noya, F.; Fabiano E. and Arias A. (1996). Producción y utilización de Sideróforo por un aislamiento de *Rhizobium meliloti*. Memorias XVIII Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia.

Nutman, P. S. (1956). The influence of the legume in the root-nodule symbiosis. Biologycal Review 31: 109-151.

Otamendi, H. and Ossana, J. E. (1978). Resultados y experiencias durante el período 1971 a 1975 sobre implantación y manejo de alfalfares en el S. O. de la Prov. de Córdoba (Dpto. de Río Cuarto); su importancia zonal. En Alfalfa. Fijación de nitrógeno y Decadencia de los alfalfares. Bolsa de Cereales. Buenos Aires. pp. 155-165.

Parodi, L. R. (1974). Alfalfa. Enciclopedia argentina de agricultura y jardinería. V. 2: El cultivo de las plantas útiles, 2ª. Parte. Buenos Aires, Acme. pp. 758-775.

Patriarca, E.; Tatè, R. and Iaccarino, M. (2002). Key role of bacterial NH_4^+ metabolism in *Rhizobium*-plant symbiosis. Microbiol.Mol. Biol. Rev. 66: 203.222.

Patriquin, D. G. (1986). Biologycal husbandry and the “nitrogen problem”. B.A.H. 3:167-169.

Paul, E. A. and Clark, F.E. (1989). Soil mierobiology and biochemistry. San Diego, Academic Press. p. 275.

Phillips, D. A.; Streit, W. R.; Volpin, H. and Joseph, C. H. (1997). Plant regulation of root colonization by *Rhizobium meliloti*. In Biological fixation of nitrogen for ecology and sustainable agriculture. Ed. by Legocki, A.; Bothe, H. and Puhler, A. Springer. p. 187-195.

Polhill, R. M. and Raven, P. H. (1981). Advances in Legume Sistematics. Part 1, Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 425.

Racca, R. (2003). Conferencia "Ecofisiología de la simbiosis *Rhizobium*- leguminosa". Curso de Post- Grado Aspectos fisiológicos y bioquímicos de las relaciones plantas-microorganismos. Córdoba, Argentina.

Radke, J. K.; Andrews, R. W.; Janke, R. R. and Peters, S. E. (1988). Low-input crooping systems and efficiency of water and nitrogen use. *In:* Hargrove, W. I. (Ed.). Crooping Strategies for Efficient Use of Water and Nitrogen. American Society of Agronomy. Spec. Publ. N°51.

Ronchi, A. L. (1994). Selección de soportes para la producción de inoculantes para leguminosas. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Pampa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. p. 178.

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

Segovia, L.; Piñero, D.; Palacios, R. and Martínez Romero, E. (1991). Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. Appl. Environ. Microbiol. 57:426-433.

Selander, R.; Caugant, D.; Ochman, H.; Musser, J.; Gilmur, M. and Whittan, T. (1986). "Methods of Multilocus Enzime Electrophoresis for Bacterial Population Genetics and Systematics. Appls. and Environ. Microbiol. Sol 51, N° 5: 873-884.

Smith, D. (1969). Influence of the temperatura on the yield and chemical composition of “Vernal” alfalfa at first flower. Agronomy Journal 61(3): 470-472.

Spaink, H. P. (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 54:257-288.

Spratt, E. D.; Gorby, B. J. and Ferguson, W. S. (1972). Production of eight cropping systems on saline and gleysolic alluvium soil, The Pas, Manitoba. Canadian Journal of Soil Science 52: 187-193.

Stougaard, J. (2001). Genetics and genomics of root symbiosis. Curr Opin Plant Biol. 4: 328-335.

Stuurman, N. L.; Bras, C. P.; Schlaman, H. R. M.; Wijfjes, A. H. M.; Bloemberg, G. and Spaink, H. P. (2000). Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-hostrangevectors to visualize rhizobia interacting with plants. Mol. Plant-Microbe Interact. 13: 1163-1169.

Temple, S. J.; Vance, C. P. and Gantt, J. S. (1998). Glutamate synthase and nitrogen assimilation. Trends Plant Sci. 3: 51-56.

Toro, N. (1996). Nodulation competitiveness in the *Rhizobium*-legume simbiosis. World J. Microbiol. Biotechnol. 12: 157-162.

Tucker, B. B.; Cox, M. B. and Eck, H. V. (1971). Effect of rotations, tillage methods, and nitrogen fertilization on winter wheat production. Agronomy Journal 52 (5): 267-271.

Van Eijsden, R.; Díaz, C. L.; de Pater, B. S. and Kijne, J. W. (1995). Sugar-binding activity of pea (*Pisum sativum*) lectin is essential for heterologous infection of transgenic white clover hairy roots by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae.* Plant Mol. Biol. 29: 431-439.

Van Rhijn, P. and Vanderleyden, J. (1995). The *Rhizobium*-plant simbiosis. Microbiol. Rev. 59: 124-142.

Vincent, J. M. (1970). A manual for the practical study of the root nodule bacteria. IBP handbook no. 15. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Wang, T. and Romero-Martinez, J. (2005). Taxonomía de *Rhizobium*. Depto. De Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional y Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México.

Wang, T.; Martínez Romero, M. and López Lara, I. (2005). *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas. Laboratorio de Microbiología Agrícola, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México. Conjuntamente con el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México.

Waterman, P. G. (1994). Costs and benefits of secondary metabolitos of the Leguminosae. In: Advances in Legume Sistematics 5: the Nitrogen Factor (J. I. Sprent and McKey, D., eds.), Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 129-149.

White, J. G. H. (1965). Comparative studies on growth and nodulation of subterranean clover and lucerne. Ph. D. Thesis. Adelaida University. s. p.

Woodruff, C. M. (1967). Crop response to lime in te Midwestern United Status. Madison, Wisconsin, American Society of Agronomy, pp. 221-222.

Infoagro (2005). http://www.infoagro.com/herbaceos/forrajes/alfalfa.asp

Perticari, A. Pasturas de alfalfa: importancia de una adecuada inoculación. IMYZA- CICVyA - INTA Castelar. http://www.ipcva.com.ar.

de Felipe Antón, M. R. Biotecnologías limpias en Agricultura. Centro de Ciencias Medioambientales. CSIC. http://www.ranf.com/publi/mono/011/felipe.pdf

González, F.; Griecco, G.; Casaretto, E.; Carbo, A.; Peixoto, L.; Castro, S.; Pérez, E., Labandera, C. and Martínez-Drets, G. Caracterización Simbiótica y Molecular de Cepas Nativas de *Sinorhizobium Meliloti*. Departamento de Microbiología de Suelos, División de

Suelos y Aguas, Dirección General de Recursos Naturales (MGAP). En colaboración con el Departamento de Bioquímica, IIBCE (Unidad Asociada a Facultad de Ciencias). En: Actas de Bioquímica y Biología Molecular. Vol. 2. Segundas Jornadas de Bioquímica y Biología Molecular (SBBM). Instituto Clemente Estatal, Montevideo, 2003. http://www.iibce.edu.uy/SBBM/Acta.pdf

Labandera, C. Alfalfa con todo. Artículos de difusión. Departamento de Microbiología de Suelos. Uruguay. http://www.chasque.apc.org/microlab/LMSCI/Difusion/alfalfacontodo.htm

Denton, M. D.; Hill, C. R.; Bellotti, W. D.; Ballard, R. A. and Gibson, A. H. Host specificity of the annual Medic-Rhizobium Simbiosis. The University of Adelaide, Roseworthy SA 5371; South Australian Research and Development Institute, PO Box 397, Adelaide, SA 5001 and CSIRO, Division of Plant Industry, Canberra, ACT 2601. http://www.iibce.edu.uy/SBBM/Acta.pdf