

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA



Tesina presentada para obtener el grado académico de

LICENCIADO EN QUIMICA

*“Incidencia de rizobacterias locales  
en el rendimiento de alfalfa en  
suelos que sufrieron salinización por  
anegamiento”*

**Autor:** MARTIN, Pedro Pablo

**Director:** Dra. RONCHI, Ana Lía

**Co- Director:** Ing. SCARONE, Jorge

Santa Rosa (La Pampa)

Argentina

2012

"Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Química de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Departamento de Química durante el período comprendido entre Septiembre de 2010 y Julio de 2012, bajo la dirección de la Dra. Ronchi, Ana Lia y la co-dirección del Ing. Scarone, Jorge."

26 de Septiembre de 2012

Pedro Pablo Martin

DEPARTAMENTO DE QUIMICA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

## **AGRADECIMIENTOS**

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

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

Al Ing. Jorge Scarone, por su colaboración y co-dirección de esta Tesina, y por las gratas charlas durante los viajes al campo.

A los investigadores del IBBM (Instituto de Bioquímica y Biología Molecular) por el aporte en los análisis de identificación.

A todos mis compañeros de Laboratorio, que colaboraron con el desarrollo de mi Tesina en especial a Silvana y Romina.

Al Dr. Javier Breccia y a todos los integrantes del Laboratorio de Biocatálisis, por darme la posibilidad de desarrollar mi Beca de Investigación y por la formación recibida.

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

A mis padres, que confiaron en mí y me dieron todo, dejándome el legado más importante que pudiera recibir, mis estudios universitarios, por lo cual estaré eternamente agradecido.

A mis Hermanos, por estar siempre y comprenderme en todo momento.

A mis compañeros de Facultad.

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

A Dany y Lucas, por ser mis Hermanos del alma y por estar siempre, estaré eternamente agradecido.

A mi Novia, por hacerme muy Feliz y por toda su comprensión.

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

**A todos... MUCHAS GRACIAS!!!**

**RESUMEN:**

El agotamiento de los suelos es una manifestación de complejos desequilibrios funcionales, sólo superable con la utilización de mecanismos de análisis y propuestas de acción que se efectivizan a través del conocimiento científico alcanzado en la materia.

Las pasturas en base a leguminosas que es necesario establecer, resultan fuertemente limitados por dos factores, la disponibilidad hídrica y la fertilidad natural de los suelos. Para el segundo caso, la aplicación de fertilizantes parece la solución de mayor viabilidad, pero éstos pueden ser contaminantes, por lo que la fertilización biológica es una alternativa superadora.

La región semiárida pampeana, ha tenido un ciclo rico en lo que hace al aporte de precipitación pluvial, a lo que ha sucedido inmediatamente después, un período de escasas lluvias. Es así que muchos productores, tienen en sus establecimientos necesidad de implantar cultivos de cosecha o pasturas en área que estuvieron anegadas durante el tiempo necesario para la salinización de sus tierras.

Por lo que se plantea como hipótesis que el conocimiento y manejo adecuado de las bacterias con efecto PGPR y sus formulaciones como inoculantes se traduce en un incremento en el rendimiento de los cultivos. Y El objetivo es: evaluar el incremento en el rendimiento de cultivos de alfalfa mediante la acción de microorganismos PGPR aislados de zonas que estuvieron anegadas durante el tiempo necesario para la salinización de sus tierras.

**ABSTRACT:**

The soil depletion is a complex manifestation functional imbalances, only matched by the use of analysis and proposed mechanisms of action that are carried out through the scientific knowledge in this field reached.

Pasture legumes based on the need to establish, are severely limited by two factors, the availability of water and the natural fertility of the soil. For the second case, the application of fertilizers appears more feasible solution, but these may be contaminants, so that fertilization is a better alternative biological.

The Pampean semiarid region, has had a rich cycle which makes the contribution of rainfall, to what happened immediately after a period of low rainfall. Thus, many producers have in their institutions need to implement harvest crops or pastures were flooded area long enough for their land salinization.

As hypothesized that knowledge and proper handling of bacteria and PGPR effect as inoculants formulations results in an increase in crop yields. And the objective is to evaluate the increase in alfalfa yield by the action of microorganisms isolated PGPR areas were flooded during the time required for their land salinization.

## INDICE

1.	Introducción	1
1.1.	Importancia agronómica del Nitrógeno. Ciclo del elemento	1
1.2.	Interacciones Planta- Microorganismo. PGPR	3
1.3.	Fijación Simbiótica de Nitrógeno	7
1.4.	Proceso de Nodulación y señalización de la simbiosis	9
1.4.1.	Señalización de la simbiosis	10
1.4.2.	Infección	11
1.4.3.	Invasión del nódulo y diferenciación	13
1.4.4.	Tipos de Nódulos	14
1.4.5.	Funcionamiento del nódulo	15
1.5.	Las leguminosas	17
1.6.	Características e importancia del cultivo de alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> )	18
1.6.1.	Importancia del cultivo	18
1.6.2.	Características de la alfalfa	19
1.6.2.1.	Requerimientos Nutricionales	20
1.6.2.2.	Requerimientos edafoclimáticos	22
1.7.	Factores abióticos que influyen en el desarrollo de los cultivos	23
1.7.1.	Efectos del estrés salino en las plantas	24
1.7.1.1.	Daño osmótico	24
1.7.1.2.	Daño iónico	24
1.7.1.3.	Daño oxidativo	25
1.7.2.	Efectos del estrés salino en la simbiosis Rhizobium-leguminosa	25
2.	Hipótesis y Objetivo	26
3.	Materiales y métodos	27
3.1.	Selección de las zonas de muestreo y caracterización de los suelos	27
3.2.	Microorganismos	27
3.3.	Semillas	28
3.4.	Ensayo en cámara climatizada	29
3.5.	Caracterización de los aislamientos	33
3.5.1.	Morfología de las colonias	34
3.5.2.	Observación microscópica	33
3.5.3.	Tinción de Gram	33
3.5.4.	Electroforesis de isoenzimas	33
3.5.5.	Desarrollo en medio líquido y determinación de parámetros cinéticos de crecimiento	35
3.5.6.	Crecimiento de los microorganismos a distintas concentraciones de NaCl	35
3.5.7.	Determinaciones genéticas por las técnicas de PCR	36
3.6.	Ensayo en Invernadero	37
3.6.1.	Condiciones experimentales	38
3.6.2.	Parámetros de efectividad simbiótica	38
3.7.	Ensayo a campo	39
3.7.1.	Condiciones experimentales	39
3.7.2.	Parámetros de efectividad simbiótica	39
3.8.	Tratamiento estadístico	40
4.	Resultados y discusión	41
4.1.	Selección de las zonas de muestreo y caracterización de los suelos	41
4.2.	Microorganismos	43

<b>4.3.</b>	<b>Ensayo en cámara climatizada</b>	44
<b>4.3.1.</b>	<b>Elección de los aislamientos</b>	44
<b>4.3.2.</b>	<b>Análisis cualitativo</b>	45
<b>4.3.3.</b>	<b>Parámetros evaluados</b>	47
<b>4.3.3.1.</b>	<b>Peso seco</b>	47
<b>4.3.3.2.</b>	<b>Contenido de Nitrógeno total</b>	48
<b>4.3.3.3.</b>	<b>Contenido de Proteína</b>	49
<b>4.3.3.4.</b>	<b>Índice de Eficiencia Relativo (IER)</b>	49
<b>4.3.3.5.</b>	<b>Correlación entre los valores de peso seco y porcentaje de nitrógeno</b>	51
<b>4.4.</b>	<b>Caracterización de los aislamientos</b>	51
<b>4.4.1.</b>	<b>Morfología de las colonias</b>	52
<b>4.4.2.</b>	<b>Observación microscópica y tinción de GRAM</b>	52
<b>4.4.3.</b>	<b>Electroforesis de isoenzimas (M.L.E.E.)</b>	53
<b>4.4.4.</b>	<b>Desarrollo en medio de cultivo líquido y determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento: velocidad de crecimiento y tiempo de generación</b>	54
<b>4.4.5.</b>	<b>Crecimiento de los microorganismos a distintas concentraciones de NaCl</b>	55
<b>4.4.6.</b>	<b>Determinaciones genéticas por las técnicas de PCR</b>	56
<b>4.4.6.1.</b>	<b>Identificación de los aislamientos por medio de la secuenciación del gen 16S</b>	57
<b>4.5.</b>	<b>Ensayo en invernadero</b>	59
<b>4.5.1.</b>	<b>Análisis Cualitativo</b>	59
<b>4.5.2.</b>	<b>Parámetros evaluados</b>	61
<b>4.5.2.1.</b>	<b>Peso Seco</b>	61
<b>4.5.2.2.</b>	<b>Contenido de Nitrógeno total</b>	62
<b>4.5.2.3.</b>	<b>Contenido de Proteína</b>	62
<b>4.5.2.4.</b>	<b>Correlación entre Peso seco y porcentaje nitrógeno</b>	63
<b>4.6.</b>	<b>Ensayo a Campo</b>	64
<b>4.6.1.</b>	<b>Análisis Cualitativo</b>	64
<b>5.</b>	<b>Conclusiones</b>	66
<b>6.</b>	<b>Bibliografía</b>	68

## 1.INTRODUCCIÓN

La búsqueda de nuevas alternativas que ayuden a disminuir los costos de la producción agrícola, aumentar los rendimientos y beneficios económicos, cuidar el ambiente y por ende lograr un desarrollo sostenible obliga a estudiar la posibilidad de utilizar el potencial que tienen las bacterias que nodulan las raíces de las leguminosas, de manera tal que puedan utilizarse para fijar el nitrógeno presente en la atmosfera y contribuir de manera ecológica a la nutrición de las mismas. El seleccionar cepas autóctonas con alta capacidad de competencia en lugar de introducir otras que, aunque competitivas, provienen de nódulos o suelos ajenos al sitio en cuestión y que por su influencia, compiten con las cepas introducidas y dan lugar a un menor rendimiento (Thies *et. al.* 1991), indicaría que puede ser ventajoso utilizar rizobios nativos como biofertilizantes. Esto constituiría una posible alternativa para el enriquecimiento de los suelos, desarrollo y mejor rendimiento de los cultivos.

### 1.1 Importancia del Nitrógeno. Ciclo del elemento.

El nitrógeno es el factor limitante más importante para el desarrollo de las plantas, dado que este se encuentra formando parte de compuestos fundamentales (Figura 1) como proteínas, ácidos nucleicos, clorofila, etc.

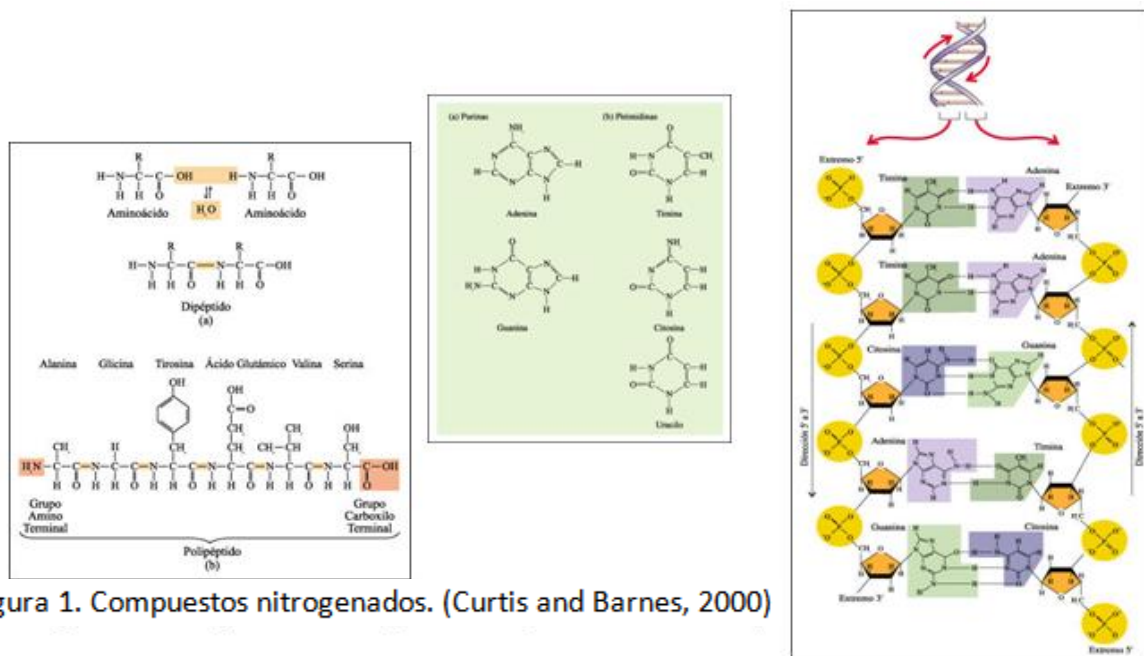


Figura 1. Compuestos nitrogenados. (Curtis and Barnes, 2000)



Dentro de los ciclos biogeoquímicos de los elementos minerales, el del nitrógeno (Figura 2) es especialmente complicado por encontrarse, en condiciones naturales en distintos estados de valencia (de +5 a +3) formando compuestos estables (Olivares 2008).

El mencionado elemento se encuentra en forma libre (estado gaseoso) y en mayor abundancia en la atmósfera (78 %). Sin embargo, es tan estable, que apenas se combina con otros y, por lo tanto, es difícil que los organismos lo asimilen, ya que primero necesitan desdoblarlo y emplearlo en la síntesis de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y otras moléculas fundamentales para su metabolismo.

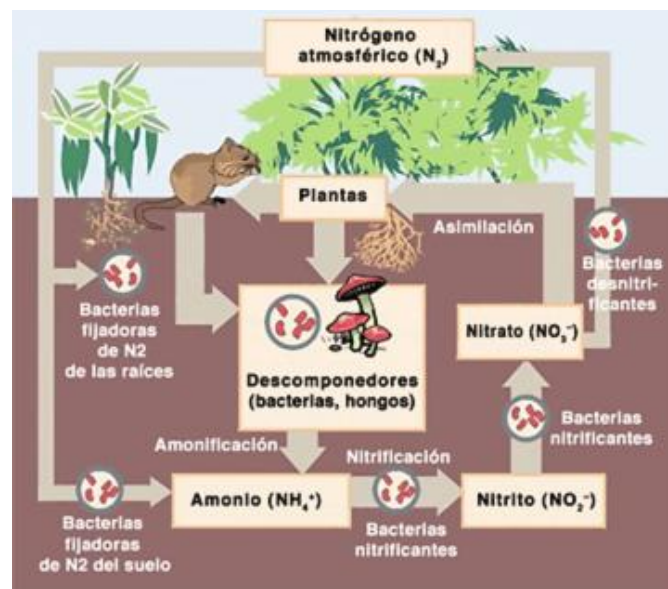


Figura 2. Esquema del Ciclo del Nitrógeno.

([http://www.epm.com.co/bibliotecaepm/biblioteca\\_virtual/ciclo\\_nitrogeno.htm](http://www.epm.com.co/bibliotecaepm/biblioteca_virtual/ciclo_nitrogeno.htm))

Se ha demostrado que la vía normal de ingreso de nitrógeno a las plantas proviene del suelo, y que para ser absorbido, se debe encontrar mineralizado, como nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) o amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). Siendo el primero, la forma más usual tomada por la planta (Olivares 2008). Sin embargo, debido a que se acumula principalmente en formas orgánicas en el suelo, se hace necesaria su transformación microbiana, conocida como mineralización, para dejarlo disponible para las plantas (Urzúa, 2000). Puede observarse en la Figura 2 que las vías de ingreso de nitrógeno al sistema agrícola son: fijación biológica (simbiótica y no

simbiótica), mineralización (amonificación) de residuos orgánicos animales y vegetales y aporte de fertilizantes orgánicos y/o inorgánicos (no se muestra en la figura).

La agricultura moderna utiliza plantas con potenciales productivos cada vez mayores, demandando una elevada nutrición nitrogenada, la cual puede ser muy superior al aporte de nitrógeno del suelo. Por lo tanto, en la mayoría de los cultivos es necesario suplementar con fertilizantes nitrogenados. Esto conlleva un considerable aumento en los costos de producción, así como también incrementos en la alteración del aire, del agua y del suelo, por los contaminantes que normalmente acompañan a los fertilizantes como inertes. Y, dado que más de la mitad del fertilizante aplicado termina en ríos, lagos y mares, contribuye al proceso de eutrofización, al descontrolado crecimiento de algas en las plataformas marinas, como así también desbalances nutricionales en los suelos, con pérdida de materia orgánica.

Resulta por ello 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 su destino. Como se observó anteriormente (Figura 2), existe otra vía de aporte de nitrógeno al sistema agrícola, llamada **fijación biológica de nitrógeno (FBN)**, la cual es llevada a cabo por microorganismos procariotas en vida libre o en simbiosis (asociación mutualista con las plantas), denominándose en este último caso, **fijación simbiótica de nitrógeno (FSN)**. A través de esta vía es posible obtener un importante suministro de nitrógeno para determinadas especies vegetales (principalmente leguminosas), las que en simbiosis con estas bacterias fijadoras de nitrógeno, principalmente rizobios, obtienen este elemento a un costo generalmente reducido (Urzúa, 2000; Olivares, 2004; Russelle and Birr, 2008).

### **1.2 Interacciones Planta- Microorganismo. PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria).**

La rizósfera abarca los milímetros de suelo alrededor de la raíz de la planta, donde ocurren procesos biológicos y ecológicos muy complejos. Éstas interacciones complejas, tanto químicas, como físicas y biológicas son experimentadas por las plantas terrestres, donde la raíz interacciona con el ambiente del suelo. Dichas interacciones involucran la raíz de las

plantas, y las mismas pueden ser del tipo: raíz-raíz, raíz-insecto y raíz-microorganismo, las que pueden ocasionar interacciones tanto positivas como negativas (Figura 3).

Las interacciones positivas incluyen asociaciones simbióticas con bacterias, hongos micorrízicos y colonización de las raíces por agentes bacterianos de biocontrol y promoción del crecimiento de las plantas (PGPB). Las interacciones negativas, incluyen competición por parásitos de las plantas, patogénesis bacteriana o fúngica e invertebrados herbívoros. Todas se llevan a cabo gracias a un proceso de señalización en el que se encuentran involucradas diferentes sustancias químicas, conocidas como *exudados radiculares* (Bais *et. al.*, 2006).

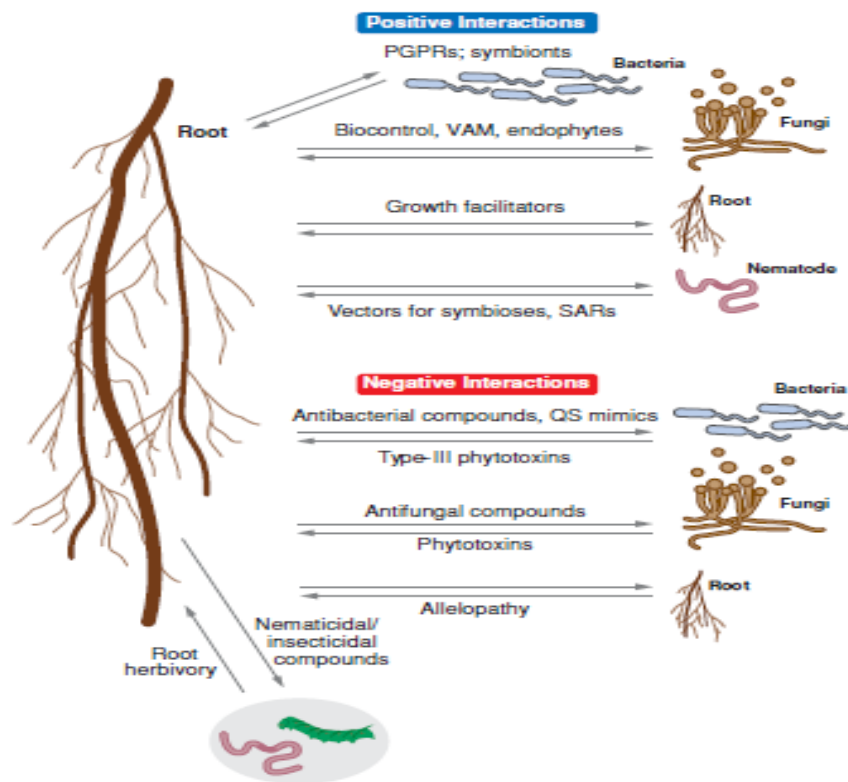


Figura 3. Representación de las posibles interacciones rizosféricas mediadas por exudados radiculares. (Bais *et. al.*, 2006).

Para un gran número de plantas, estos exudados juegan un rol indirecto en la competición por los recursos, alterando la composición química y los procesos del suelo, como así

también las poblaciones microbianas, cumpliendo un rol directo en el desarrollo de asociaciones entre las plantas y sus hospedadores (Bais *et. al.*, 2006).

Dentro de las poblaciones microbianas que se encuentran en el suelo, hay un especial interés en aquellos microorganismos que pueden provocar efectos benéficos sobre las plantas y principalmente sobre los sistemas de cultivos. En este aspecto, las rizobacterias promotoras del crecimiento son quienes reciben el mayor interés.

Las PGPR (Plant growth-promoting rhizobacteria), fueron definidas por primera vez por Kloepper y Schroth (1978), como un grupo de bacterias presentes en el suelo que colonizaban las raíces de las plantas, o que inoculadas sobre las semillas producían un aumento en el crecimiento de las primeras.

Este grupo de bacterias pertenece a la familia *Rhizobiaceae*, que se agrupan en seis géneros: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. Los rizobios poseen una morfología normalmente bacilar y no son formadores de esporas. El aspecto de las colonias depende del medio de cultivo y de la especie, en general tienen un aspecto mucilaginoso debido a la presencia de polisacáridos extracelulares y su forma varía desde plana a convexa. El color va desde blanco opaco poco gomosa, a blanco lechosa translúcida, según la cantidad de polisacáridos. Son aerobios, sin embargo son capaces de crecer a una tensión de oxígeno menor de 0,001 atm (Frioni, 1999; Azcón-Bieto and Talón, 2000). Comparten la característica distintiva de formar nódulos fijadores de nitrógeno en las leguminosas (Figura 4) y de allí proviene su gran importancia agronómica y ecológica (Lodeiro *et. al.*, 2003).

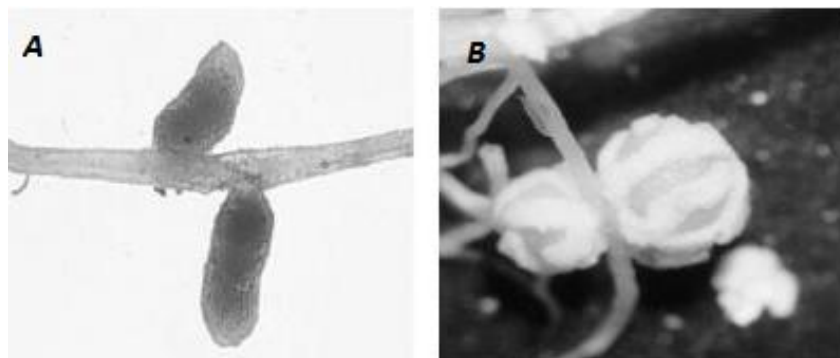


Figura 4. Fotografías de nódulos en raíces de leguminosas. A: nódulos indeterminados (forma alargada); B: nódulos determinados (forma redondeada) (Lodeiro *et. al.*, 2003).

Los rizobios pueden encontrarse en la naturaleza en dos formas de vida: una de ellas “en *vida libre*”, que es la condición en que se encuentran en el suelo o bien en las etapas iniciales de la colonización e infección de la raíz, y la otra, como “*bacteroides*” encontrándolos en el interior de los nódulos.

Ambas formas difieren sustancialmente en su morfología y metabolismo, es así, que los rizobios en vida libre son bacilos móviles, incapaces de fijar nitrógeno y utilizan una variedad de fuentes de carbono, mientras que los bacteroides tienen formas irregulares, son inmóviles, fijan nitrógeno y sólo pueden utilizar ácidos dicarboxílicos como succinato o malato como fuentes de carbono (Lodeiro *et. al.*, 2003).

Para que el proceso de colonización de la raíz se lleve a cabo, las PGPR deben cumplir tres características intrínsecas: (i) ser capaces de colonizar la raíz y/o su zona de influencia; (ii) sobrevivir y multiplicarse en los micro-hábitat asociados a la superficie de la raíz donde compiten con la microbiota natural, al menos el tiempo suficiente para ejercer de forma efectiva su actividad promotora del crecimiento y (iii) estimular el crecimiento vegetal (Kloepper, 1994).

Dichas PGPRs, poseen rasgos y genes específicos que contribuyen al proceso de colonización, aunque solo unos pocos han sido identificados; dentro de estos rasgos se incluyen: movilidad, quimiotaxis hacia la semilla y los exudados radiculares, producción de fimbrias, capacidad para usar componentes específicos de los exudados de la raíz, secreción de proteínas y quórum sensing (Lugtenberg *et. al.*, 2001).

Otro aspecto importante de la colonización, es la capacidad de competir con microorganismos nativos ya presentes en el suelo y en la rizósfera. La comprensión de estas interacciones ha sido restringida en parte, por la incapacidad para cultivar y caracterizar diversos miembros de la comunidad de la rizósfera y determinar cual comunidad varía con la especie de planta, edad, localización de la raíz y propiedades del suelo (Nelson, 2004).

Los efectos producidos por las PGPR se pueden dar a través de mecanismos directos o bien indirectos, pero los mecanismos específicos involucrados no han sido bien caracterizados (Glick, 1995; Kloepper, 1993). Dentro de los mecanismos indirectos, la

promoción del crecimiento, es a través de la disminución o prevención de los efectos negativos de microorganismos patógenos en su mayor parte por la síntesis de antibióticos (Sivan, 1992) o sideróforos (Leong, 1986). Los mecanismos directos incluyen: síntesis de fitohormonas (Xie *et. al.*, 1996), fijación de nitrógeno (Christiansen-Weneger, 1992), reducción del potencial de membrana de la raíz (Bashan and Levanony, 1991), síntesis de algunas enzimas que modulan el nivel de hormonas en la planta (Glick *et. al.*, 1998), solubilización de fosfato inorgánico y mineralización de fosfato orgánico, los cuales hacen que el fósforo esté más disponible para la planta (Krasilnikov, 1961). De todos ellos, las PGPRs pueden hacer uso de uno o más de estos mecanismos.

La estructura de las comunidades rizobianas, puede ser caracterizada tanto en forma fenotípica como genotípica. Dentro de los métodos fenotípicos, que dependen de la capacidad para cultivar los microorganismos, se pueden mencionar: perfil de fosfolípidos y ácidos grasos (PLFA), como así también perfil de ésteres metilados de ácidos grasos (FAME) (Germida *et al.*, 1998). En cambio, los métodos genotípicos emplean técnicas de biología molecular y se basan en la extracción directa de DNA del suelo y el análisis de la secuenciación del gen 16S-rRNA o su expresión en sistemas de clonado (Rondon *et. al.*, 1999).

### **1.3 Fijación Simbiótica de Nitrógeno**

La FBN (Fijación Biológica de Nitrógeno) presenta un gran interés, circunstancia que ha determinado que sea considerada objeto de intensa investigación desde su descubrimiento en 1888. También contribuye globalmente de forma importante al suministro del nitrógeno requerido por las plantas, el resto del nutriente necesario procede casi en su totalidad del amonio sintetizado vía Haber-Bosch, proceso con un elevado gasto de energía (alrededor del 1% de la energía consumida a nivel mundial). La FBN cobra mayor importancia dentro de la Agricultura Sostenible, ya que evita el uso abusivo de fertilizantes nitrogenados, con el consiguiente ahorro de energía y la disminución de la degradación del medio (Olivares, 2008).

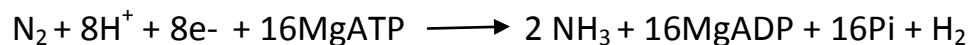
El nitrógeno se encuentra en gran parte en la atmósfera, ocupando alrededor de un 78%, bajo la forma de N<sub>2</sub>, sin embargo y debido a que el triple enlace entre los dos átomos de nitrógeno, hace que la molécula sea casi inerte, de manera tal que el elemento no puede ser aprovechado por la mayoría de las formas vivientes, sino solo por un pequeño grupo de microorganismos altamente especializados, que incluyen actinomicetes, algas y bacterias.

Para ser utilizado por las plantas en su crecimiento, primeramente debe ser reducido y posteriormente “fijado” (combinado) en la forma de iones amonio o nitrato, que son las formas asimilables por los vegetales. El proceso a través del cual esos microorganismos reducen el nitrógeno hasta una forma utilizable es conocido como Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN), dentro de esta la Fijación Simbiótica de Nitrógeno (FSN) es llevada a cabo por la acción de microorganismos procariotas en asociación con las plantas, los cuales son capaces de expresar funcionalmente el complejo de la nitrogenasa (Halbleib and Luden, 2000), que es la enzima que cataliza la reducción de N<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub>.

La estructura de dicha enzima, se encuentra conservada en la mayoría de los diferentes organismos fijadores de nitrógeno (Smith, 2002), y la misma consta de dos componentes: el **componente I** o dinitrogenasa codificado por los genes *nifD* y *NifK*, que tiene un cofactor de hierro-molibdeno (FeMo-Co) con el sitio activo; y el **componente II** o dinitrogenasa reductasa codificado por los genes *NifH* (Rubio and Ludden, 2008).

La reducción de nitrógeno por la nitrogenasa, incluye tres transferencias de electrones (Igarashi and Seefeldt, 2003):

- a) La reducción del componente II por una ferredoxina.
- b) La transferencia sucesiva de electrones desde el componente II al componente I, en un proceso dependiente de MgATP, con una estequiometría mínima de 2 MgATP hidrolizados por electrón transferido.
- c) La transferencia de electrones al nitrógeno, que se encuentra unido al centro activo del componente I



El complejo nitrogenasa, simultáneamente con la reducción del nitrógeno ( $N_2$ ) cataliza la reducción de protones ( $H^+$ ) a hidrógeno ( $H_2$ ), lo cual le supone una limitación importante; para contrarrestar esta pérdida de eficiencia, el bacteroide es capaz de reciclar el hidrógeno ( $H_2$ ) a protones ( $H^+$ ) por la hidrogenasa, excepto las cepas de rizobios que son hup (-) (Hydrogen uptake) carentes de esta actividad (Imperial *et. al.*, 2006).

#### **1.4 Proceso de Nodulación y señalización de la simbiosis**

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 de éste, debido a que exudan una variedad de aminoácidos, proteínas, azúcares, flavonoides, alcoholes, vitaminas, hormonas y ácidos orgánicos. 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 (Gaworzewska and Carlile, 1982) o en forma selectiva hacia ciertos flavonoides liberados por su hospedante simbiótico (Caetano Anollés *et al.*, 1988). 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 *et. al.*, 2003).

El establecimiento de la simbiosis puede resumirse como el resultado de tres eventos: a) la infección intracelular de las células hospedadoras por el microsimbionte; b) el desarrollo y organogénesis del nódulo; y c) el proceso de fijación de nitrógeno. El primero y segundo evento ocurre simultáneamente, mientras que la fijación se da después de que la organogénesis está completada y sólo si la infección bacteriana es la adecuada.

##### **1.4.1. Señalización de la simbiosis**

Un diálogo molecular entre el microorganismo y la planta inicia el proceso de simbiosis, similar al que ocurre entre la planta y otros microorganismos patógenos (Samac and



Graham, 2007). Los exudados radicales liberan determinados compuestos del metabolismo secundarios, identificados como flavonoides, que son esenciales para el establecimiento de la simbiosis. Estos flavonoides son percibidos por los rizobios compatibles que hay en la rizósfera, los que inducen la expresión del operón de nodulación (genes *nod*, *nol* o *noe*), implicado en la síntesis de los llamados factores Nod (Figura 5). Estos factores Nod de naturaleza lipoquitoligosacáridos (LCO), consisten de cuatro o cinco unidades de  $\beta$ -1,4 *N* acetilglucosaminas, que varían su estructura básica y especificidad molecular dependiendo de la especie de rizobio. Por lo tanto los factores Nod son considerados elementos claves para la especificidad de la simbiosis (Supanjani *et. al.*, 2006).

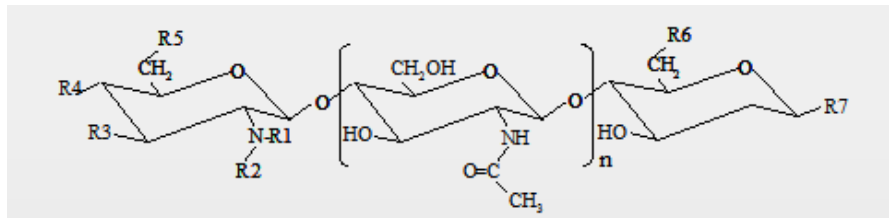


Figura 5. Esquema general del lipoquitoligosacárido o factor Nod producido por los rizobios.  $n$  puede variar entre 1 y 4. Los sustituyentes que se describen como grupos R son propios de cada especie bacteriana. De esta manera a cada flavonoide corresponde un LCO concreto lo que determina la especificidad de la simbiosis (Lodeiro *et. al.*, 2003).

Por su parte los rizobios secretan polisacáridos que se unen a ciertas proteínas de la planta (lecitinas), encontradas en los extremos de los pelos radicales sobre los que se adhieren. Cada rizobio expresa constitutivamente un grupo de factores de transcripción, conocidos como NodD cuyo número y regulación va a depender de la especie de rizobio. En *Sinorhizobium meliloti* hay tres copias de NodD, siendo dos de ellas, NodD1 y NodD2, activadas por flavonoides, mientras que NodD3 es activada por SyrM (Symbiotic Regulator), induce la síntesis de exopolisacárido (EPS) independientemente de la presencia de flavonoides (Swanson *et al.*, 1993). A su vez, estos factores Nod desencadenan en la planta numerosas respuestas, todas ellas esenciales en el proceso de

invasión y organogénesis, como ser: modificaciones en los pelos radicales, la formación del canal de infección y la división de células del cortex, que conducen a la formación del nódulo donde se llevará a cabo la fijación.

Otro componente con capacidad de integrar las respuestas epidérmicas y corticales es NIN (Nodule INception), identificado con una proteína integral de membrana con un dominio citoplasmático que conecta con el núcleo y actúa como un factor de transcripción. Esta proteína (NIN) funciona independientemente de los factores NOD, pero actúa como regulador positivo en la nodulación con una función dual, pues permite tanto la infección de las células epidérmicas (pelos radicales) por los rizobios, como las respuestas inducidas en las células de la corteza radical con la formación del primordio nodular. Claramente NIN desempeña un papel esencial durante la nodulación (Borisov *et. al.*, 2003; Marsh *et. al.*, 2007).

### 1.4.2. Infección

En paralelo con la diferenciación y desarrollo del nódulo, debe producirse la infección de la raíz por parte de los rizobios. Fåhraeus describió con excelentes micrografías las etapas características de la infección (Sahlman and Fåhraeus, 1963). En primer lugar, notó que ocurre una curiosa deformación de los pelos radiculares, llamada *enrulado del pelo radicular* (Figura 6), en donde se observa como los rizobios quedan atrapados en la curvatura interior del pelo radicular y posteriormente penetran al mismo formando un *hilo de infección* en dirección a las células subcorticales de la raíz donde se está formando el nódulo. El hilo de infección se forma por una invaginación de la pared celular del pelo radicular, que da origen a un canal a través del cual migran los rizobios hacia la mencionada zona subcortical (Stuurman *et al.*, 2000).



Figura 6. Micrografía electrónica original de Sahlman y Fåhraeus (1963) mostrando el enrollado de un pelo radicular. Obsérvese a los rizobios englobados en la curvatura interior del pelo, y el inicio de la formación del hilo de infección (aumento: 5.500 veces) (Lodeiro *et. al.*, 2003).

Se ha establecido que no todos los pelos radiculares son infectables, pudiendo distinguirse 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. Así, Bhuvaneshwari *et al.* (1980) pudieron concluir que los pelos radiculares maduros no pueden ser infectados.

El reconocimiento de que los pelos radiculares maduros no son infectables llevó a la conclusión que el enrollado de los pelos radiculares ocurre por un crecimiento desigual de las paredes celulares a uno y otro lado del pelo. Dado que los rizobios son capaces de sintetizar y liberar reguladores del crecimiento como auxinas y citokininas, se especula que la adsorción de distintas cantidades de rizobios a uno y otro lado del pelo, junto a la liberación de reguladores del crecimiento ocasionaría el enrollado.

Las leguminosas pueden nutrirse tanto del nitrógeno del suelo como del nitrógeno atmosférico. Si estas plantas encuentran alguna fuente de nitrógeno adecuada en el suelo (principalmente nitrato) inhiben la nodulación y la infección rizobiana. Además, aún cuando la disponibilidad de nitrógeno sea baja y se requiera de la fijación simbiótica de nitrógeno, las leguminosas regulan la cantidad de nódulos totales que les permitan obtener una buena provisión de nitrógeno. Ciertos cálculos indican que la fijación

simbiótica de nitrógeno es, para la planta, más costosa en términos energéticos que la asimilación reductiva de nitrato. Por ello, tanto los nódulos poco efectivos en la fijación de nitrógeno como el exceso de nódulos aún cuando sean efectivos, representan costos energéticos que pueden debilitar al vegetal si éste nodula indiscriminadamente. El mecanismo que inhibe la formación de nuevos nódulos, cuando la planta ya dispone de un cierto número de éstos, o de fuentes de nitrógeno en el suelo, se basa en un sistema de retrocontrol (*feedback*) en el cual participan señales controladas por la parte aérea (Krusell *et al.*, 2002).

#### 1.4.3. Invasión del nódulo y diferenciación.

La última etapa de la infección es la invasión de los nódulos en formación por parte de los rizobios que provienen del hilo de infección y la diferenciación de éstos en bacteroides capaces de fijar nitrógeno. 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 la membrana peribacteroidal los rizobios pueden dividirse algunas veces y luego inician el proceso de diferenciación en bacteroides que consiste en general en un incremento del tamaño de las bacterias; 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 una membrana peribacteroidal forman cuerpos distinguibles en el citoplasma que reciben el nombre de simbiosomas. Es en ellos donde se va a producir la fijación de nitrógeno hasta que finalmente se inicie su degradación y senescencia.

Estos procesos ocurren de maneras diferentes según los nódulos sean de crecimiento determinado o indeterminado. No se conoce actualmente por qué se forman dos tipos de nódulos con diferente modo de crecimiento y organización histológica, pero sí está bastante claro que la formación de uno u otro tipo de nódulo depende de la planta y no de la bacteria, ya que la misma especie de rizobio puede dar origen a nódulos

determinados o indeterminados en distintas especies de leguminosa: por ejemplo, *R. tropici* produce nódulos determinados en poroto e indeterminados en *L. leucocephala*.

#### 1.4.4. Tipos de Nódulos

Los nódulos bacterianos pueden ser de dos tipos: **nódulos determinados**, formados en leguminosas de origen tropical, como: soja o judía, y **nódulos indeterminados** en leguminosas de origen subtropical, como: guisante o alfalfa.

Los nódulos determinados tienen forma esférica y la zona infectada está formada por células que se encuentran en un estadio similar de desarrollo, las divisiones de la zona central concluyen 12-18 días después de la inoculación, y a partir de aquí el aumento de tamaño se produce solo por crecimiento celular. Estos nódulos se desarrollan en el cortex externo de la raíz y exportan el nitrógeno en forma de ureídos. Los nódulos indeterminados en cambio, tienen forma cilíndrica y diferentes regiones en la zona central, se desarrollan en el cortex interno de la raíz y exportan el nitrógeno en forma de amidas (Maunoury *et. al.*, 2008).

En la Figura 7, se pueden observar las diferentes zonas de este tipo de nódulos:

*Zona I o meristemática:* corresponde a la zona de células en proliferación

*Zona II o de invasión:* es la región en que se produce la invasión bacteriana a través de los canales de infección, las células de esta región son más grandes que las meristemáticas al igual que sus vacuolas.

*Interzona II y III:* en esta franja, las células vegetales finalizan su proceso de diferenciación, presentan gran cantidad de transcritos de leghemoglobina, proteína encargada de regular la presencia de oxígeno en el nódulo.

*Zona III o de fijación:* región totalmente diferenciada en la que se realiza la fijación de nitrógeno, se divide en dos regiones: la zona de fijación y la zona insuficiente.

*Zona IV o de senescencia:* región en la base del nódulo, donde las células vegetales y los bacteroides degeneran (Kahn *et. al.*, 1998).

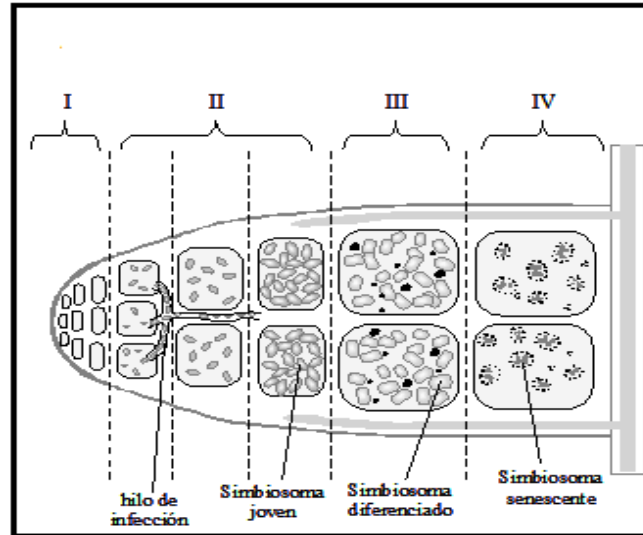


Figura 7. Esquemas de cortes longitudinales de un nódulo indeterminado (Lodeiro *et. al.*, 2003).

#### 1.4.5. Funcionamiento del nódulo

La energía necesaria para llevar a cabo el proceso de fijación de nitrógeno proviene de la fotosíntesis. Desde la parte aérea, vía floema, se transporta sacarosa hasta los nódulos, donde se hidroliza a monosacáridos para transformarse en fosfoenolpiruvato. La fosfoenolpiruvato carboxilasa cataliza la conversión de fosfoenolpiruvato en oxalacetato, que se reduce rápidamente a malato y constituye la principal fuente de energía para el bacteroide. La planta también suministra aminoácidos al bacteroide para suprimir la asimilación de amonio del microsimbionte y facilitar así, su transferencia al vegetal (Ramos and Biseling 2003) (Figura 8).

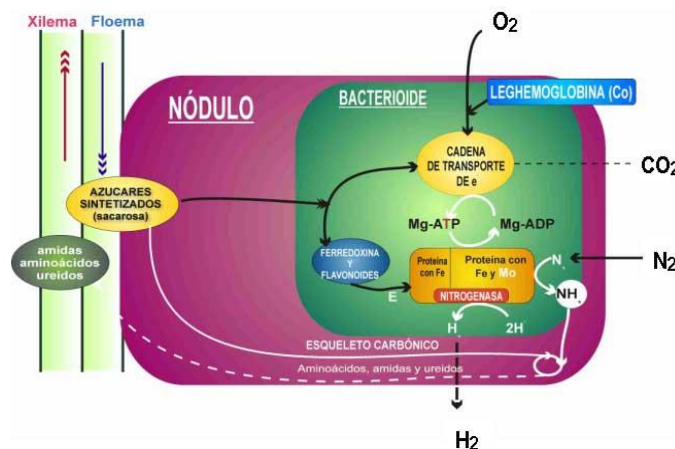


Figura 8. Funcionamiento del nódulo (<http://www.agroestrategias.com>)

El amoníaco producido durante la reducción del nitrógeno se libera al espacio peribacteroidal, donde predominan condiciones de acidez que desplazan el equilibrio  $\text{NH}_3 + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{NH}_4^+$  hacia la formación de amonio, el cual a diferencia del amoníaco, no puede atravesar las membranas del bacteroide debido a su carga (Figura 9). El amonio tóxico para la planta, es incorporado inmediatamente a esqueletos carbonados, principalmente a través del ciclo GS/GOGAT. La glutamina puede donar su grupo amida al aspartamo formando asparagina, principal amida transportada por el xilema a la parte aérea en algunas leguminosas. El amonio una vez asimilado, puede ser exportado en forma de amidas o ureidos, las leguminosas de climas templados, como: *Medicago*, *Pisum* y *Trifolium* exportan el nitrógeno en forma de amidas: glutamina, asparagina y 4-metilenglutamina, mientras que en las leguminosas de climas cálidos, como: *Glycine*, *Phaseolus* y *Vigna*, el nitrógeno es incorporado como asparagina, aspartato, glutamina y glutamato, que después son metabolizados a ureidos en los nódulos (Vance, 2008).

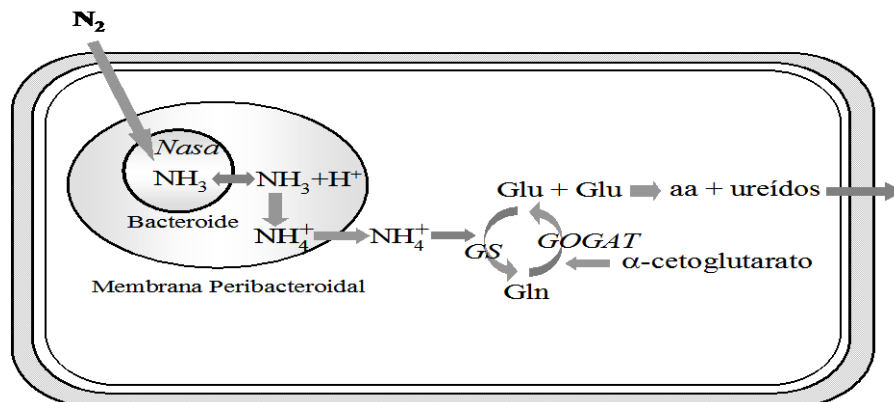


Figura 9. Esquema de la asimilación de nitrógeno por las leguminosas. Luego de la reducción del nitrógeno por parte del bacteroide, el amoníaco presente en el espacio peribacteroidal se convierte en amonio gracias a las condiciones de acidez de este compartimiento. Así, el amonio es captado por la célula vegetal, en cuyo citoplasma el ciclo GS/GOGAT cataliza su asimilación en aminoácidos. Posteriormente estos aminoácidos pueden translocarse como tales o convertirse en ureidos (Glu: glutamato; Gln: glutamina; Aa: aminoácidos; Nasa: nitrógenasa; GS: glutamino sintetasa; GOGAT: glutamato sintasa (Lodeiro *et. al.*, 2003).

### 1.5 Las leguminosas

La familia de las leguminosas, con unos 750 géneros y 20000 especies, es la tercera familia más numerosa, después de Compuestas y Orquideáceas y la segunda en importancia agronómica después de las gramíneas (Gepts *et. al.*, 2005). Las leguminosas cultivadas se pueden clasificar en dos grupos atendiendo a su uso: forrajeras y de grano. Las primeras son las que se aprovechan sus hojas y tallos mediante corte o pastoreo, mientras que en las segundas, la principal utilidad económica reside en las semillas. Dentro de las especies más utilizadas para el consumo humano se puede mencionar: guisante (*Pisum sativum*), garbanzo (*Cicer arietinum*), judía (*Phaseolus vulgaris*), haba (*Vicia faba*), soja (*Glicina max*), alfalfa (*Medicago sativa*) y trébol (*Trifolium repens*).

La importancia de las leguminosas se basa en aspectos tan importantes como: a) la potencialidad en la producción de proteínas vegetales para consumo humano y fabricación de piensos para animales; b) su utilización como pasto y forraje para el consumo animal; c) el efecto beneficioso para el ambiente, al poder utilizar el nitrógeno atmosférico como alternativa a los fertilizantes químicos, dado que poseen la capacidad para establecer simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno formando nódulos, hecho que permite que sean capaces de crecer en terrenos con baja humedad, pobres en nitrógeno o calcáreos, y d) la capacidad para colonizar ecosistemas naturales, evitando la erosión, y participando en la recuperación de suelos marginales, mejorando la fertilidad del suelo al incorporar el nitrógeno fijado a la materia orgánica (Vance, 1998).

En la agricultura, estos sistemas de Fijación de Nitrógeno, que permiten una disminución en el uso de fertilizantes químicos, han encontrado su aplicación en el aprovechamiento de asociaciones naturales entre microorganismos procariotas y plantas cultivadas, siendo las más importantes con las leguminosas, pero encontrándose también en cultivos de otras familias, entre ellos gramíneas como el arroz (Shrestha and Ladha, 1996) y la caña de azúcar (Urquiaga *et. al.*, 1992), que contribuyen con una significativa cantidad del nitrógeno fijado biológicamente (Lodeiro, 2003).

Todas la características mencionadas anteriormente, hacen que la investigación sobre aspectos básicos y tecnológicos de su biología cobre relevancia mundial, sobre todo en la



búsqueda de nuevas variedades mejor adaptadas a condiciones climáticas especiales de sequías, altas temperaturas, salinidad, etc., así como también bacterias con máxima capacidad fijadora de nitrógeno, en estas condiciones.

### **1.6 . Características e importancia del cultivo de alfalfa (*Medicago sativa*)**

La alfalfa (*Medicago sativa*) es la principal especie forrajera del país y la base de la producción de carne y leche en la Región Pampeana. La difusión de su cultivo, se apoya en sus altos rendimientos de materia seca por hectárea, su excelente calidad de forraje y su gran adaptabilidad a diversas condiciones ambientales (suelo, clima y manejo). Por otro lado, su capacidad para la fijación del nitrógeno atmosférico a través de la simbiosis con *Shinorizobium meliloti* la convierten en un importante componente de la sustentabilidad de los ecosistemas (Basigalup and Rossanigo, 2007).

#### **1.6.1. Importancia del cultivo**

El cultivo de alfalfa se encuentra muy extendido en los países de clima templado, y ha sido la ganadería intensiva la que ha demandado de forma regular a dicho cultivo, cuya finalidad es abastecer a la industria de los piensos. La importancia de ésta, va desde su interés como fuente natural de proteínas, fibra, vitaminas y minerales; así como su contribución paisajística y su utilidad como cultivo conservacionista de la fauna; también aporta elementos de interés como limitador y reductor de la erosión y de ciertas plagas y enfermedades de los cultivos que le siguen en la rotación (Infoagro, 2005).

Por su adaptación a un amplio rango de condiciones agroclimáticas y su capacidad de producir elevada cantidad de pasto y forraje, sigue siendo una de las especies forrajeras más importantes a nivel mundial (Prosperi *et. al.*, 2006).

El aumento de los rendimientos y la implantación de cultivos mejorados seguirá siendo una constante por parte de los productores ganaderos. En un futuro cercano, los principales criterios de selección seguirán siendo el aumento en el rendimiento del forraje, la persistencia y la resistencia a múltiples plagas y enfermedades, como así también, variedades adaptadas a ambientes restrictivos desde el punto de vista abiótico, dado que el avance de las zonas de pastoreo a ido desplazando las zonas de cultivo hacia

zonas con limitaciones edafoclimáticas en las que, problemas como la salinidad, acidez, sequias y anegamientos, requieren el uso de especies que puedan sobrevivir a dichas condiciones (Basigalup and Rossanigo, 2007).

#### 1.6.2. Características de la alfalfa

La alfalfa pertenece a la familia de las leguminosas y su nombre científico es *Medicago sativa*. Se trata de una planta perenne, vivaz y de porte erecto. Presenta un sistema radical robusto y profundo, y su principal función es la absorción de agua. La raíz puede alcanzar los 2 a 5 metros de longitud, en tan solo 2 a 4 años de vida, siempre que no existan impedimentos en el perfil del suelo. Dicho sistema radical puede clasificarse en cuatro tipos generales: raíz pivotante o típica, ramificada, rizomatosa y rastrera. Debido al importante sistema radicular que posee, le permite extraer el agua de capas profundas, lo que le confiere tolerancia a las épocas de sequía (Basigalup and Rossanigo, 2007).

El tallo primario es cuadrado en su sección transversal y presenta estomas y pelos. Posee además del crecimiento primario un crecimiento secundario, que da origen a un eje leñoso o porción perenne que forma parte de la corona. Es importante destacar que la corona no es una estructura simple sino que es una zona compleja que incluye varias estructuras separadas (Tueber and Brick, 1988), cuya función principal es el almacenamiento de sustancias de reservas y sede de yemas, a partir de donde se desarrollaran los rebrotes de la planta. (Basigalup and Rossanigo, 2007). Los tallos son de consistencia maciza aunque pueden encontrarse tallos huecos, en su parte herbácea presentan nudos desde donde nacen las hojas. El número de tallos depende de la edad y vigor de la planta y pueden llegar a 20. Las primeras hojas de alfalfa son unifoliadas y de forma orbicular, mientras que cuando la planta ya está desarrollada son trifoliales, compuestas de tres folíolos, unidos al tallo a través del peciolo. El borde de los folíolos es dentado, usualmente solo en el tercio superior, aunque puede extenderse hasta la mitad superior o incluso el tercio inferior. Pueden encontrarse también hojas tetrafoliadas,

pentafoliadas o de mas foliolos, que reciben el nombre de hojas multifoliadas (Basigalup and Rossanigo, 2007).

Las flores se desarrollan cuando el ápice del tallo pasa del estado de crecimiento vegetativo al reproductivo. Estas son completas y están formadas por el cáliz, la corola, los estambres y el gineceo. Pertenecen a la subfamilia *Papilionoidea*, es decir que poseen una corola papilionda en forma de mariposa. Son de color púrpura, con extremos que van desde el violeta claro al morado oscuro, aunque también pueden encontrarse flores blancas, azuladas, amarillas y variegadas, que son mezclas de colores o tonalidades que van cambiando a medida que la flor se desarrolla (Del Pozo Ibañez, 1977).

El fruto es del tipo legumbre o vaina, monocarpelar, seco e indehiscente, generalmente alargado y comprimido, con las semillas alargadas en la hilera ventral. La vaina, por encorvamiento desarrolla un espiral que generalmente posee una espira con autofecundación (Basigalup and Rossanigo, 2007).

#### 1.6.2.1. Requerimientos Nutricionales

Las pasturas de alfalfa bien implantadas y adecuadamente manejadas, convierten diariamente la energía solar en materia seca, dependiendo de los niveles de productividad propios de cada ambiente. Para llevar a cabo esto, es necesario la disponibilidad de agua y nutrientes. Los nutrientes son aportados principalmente por el suelo, siendo los más importantes: el nitrógeno, el fósforo y en menor medida el azufre y el boro (Tabla N°1). Además de estos, la alfalfa tiene grandes requerimientos de calcio y una gran sensibilidad a la acidez de los suelos.

Tabla N°1. Requerimientos Nutricionales, MACRO y MICRO nutrientes para la producción de materia seca de alfalfa (García *et. al.*, 1999).

Requerimiento			
MACRO	kg t <sup>-1</sup>	MICRO	g t <sup>-1</sup>
Nitrógeno	28,0 *	Zinc	1,5
Fosforo	2,8	Boro	2,7
Potasio	22,0	Cobre	0,7
Azufre	3,8	Manganeso	2,5
Calcio	12,0	Molibdeno	0,5
Magnesio	3,0		

\*Requerimientos mayormente provistos por la fijación biológica del nitrógeno atmosférico.

El nitrógeno es aportado en su mayoría desde la atmósfera, a través de la simbiosis con la bacteria *Sinorhizobium meliloti*, siempre y cuando el proceso de fijación se lleve a cabo en óptimas condiciones y se logre una buena inoculación de las semillas. Dado que el nitrógeno es el principal constituyente de las proteínas, una adecuada nutrición nitrogenada de la planta, contribuye a la expansión del área foliar y a una mejor calidad de forraje.

En cuanto al fósforo, es fundamental en la nutrición de la planta, dado que interviene en múltiples procesos, como en el desarrollo de la biomasa aérea y radical, la capacidad de nodulación y de fijación del nitrógeno atmosférico, la fotosíntesis, la transferencia de energía, etc. Este elemento, no solo es importante para la nutrición de la planta, sino también para la tolerancia a factores de estrés y su persistencia.

El azufre, posee funciones similares al nitrógeno, ya que integra varias proteínas, y por lo tanto contribuye a la calidad del forraje, aportando proteínas esenciales para la nutrición animal.

El potasio, además de intervenir en procesos metabólicos, tiene un rol importante en el equilibrio hídrico de las plantas, en la regulación del pH, participa en numerosos procesos metabólicos y en la acción de numerosas enzimas.

Otro de los cationes importantes es el magnesio, que tiene un rol crítico en la síntesis de clorofila (Basigalup and Rossanigo, 2007).

#### 1.6.2.2. Requerimientos edafoclimáticos

En cuanto a los requerimientos edafoclimáticos para la alfalfa, cabe destacar a la radiación solar que juega un papel muy importante en el proceso de fotosíntesis y por ende en el desarrollo del cultivo; se debe tener en cuenta que el número de horas de radiación aumenta a medida que disminuye la latitud de la región.

La temperatura es otra de las variables a tener en cuenta, pues está relacionada con la germinación de la semilla y el desarrollo de la planta, observándose que tanto temperaturas mayores a 38°C y menores a -10°C producen letalidad del cultivo, por ello el rango óptimo de temperaturas se encuentra entre los 18-28°C (Infoagro, 2005).

El suelo, debe contar con los nutrientes necesarios y ser profundo, dado que la alfalfa puede llegar a desarrollar raíces de entre 2 y 5 metros, por lo que suelos con menos de 60 cm de profundidad no son aconsejables para este cultivo (Basigalup and Rossanigo, 2007).

En cuanto al pH, la limitante para la alfalfa es la acidez, excepto en la germinación, pudiendo desarrollarse ésta hasta con pH 4. El pH óptimo es de 7,2 por lo que se requieren suelos con un pH cercano a la neutralidad. No solo influye en el desarrollo del cultivo, sino también sobre las bacterias nodulantes de alfalfa (*Sinorhizobium meliloti*), que en pH menores a 5 dejan de reproducirse, poniendo de manifiesto una deficiencia en el contenido de nitrógeno.

Además de la sensibilidad a la acidez, la alfalfa presenta gran sensibilidad a la salinidad, que se manifiesta con la palidez de algunos tejidos, la disminución del tamaño de las hojas y desequilibrios entre la raíz y la parte aérea (Infoagro, 2005).

### **1.7. Factores abióticos que influyen en el desarrollo de los cultivos**

Debido al incremento de la población mundial en alrededor de 7,2 billones para 2015 y de 8,3 billones para 2030, es necesario también incrementar la producción de alimentos. Para poder lograr esto, se pueden utilizar diferentes alternativas, las cuales van: desde aumentar el rendimiento de las cosechas, el cultivo de dos o tres especies por año, métodos más intensivos de producción, como también incrementar las áreas de cultivo (Wild, 2003). Con respecto a este último punto, la mayoría de la tierra productiva está destinada a los cultivos, una gran parte al pastoreo extensivo, y una parte restante ocupada por bosques y grandes áreas con condiciones no favorables para el desarrollo de los cultivos. Reportes del 2008 de la FAO (FAO, 2008) estiman que alrededor del 15% del área del planeta está afectada por la erosión del suelo, la degradación física y química y la salinización.

Este problema se conoce desde hace tiempos remotos, es así que existen registros históricos de migraciones provocadas por la salinización del suelo cultivable. Este fenómeno está relacionado con la acumulación de sales durante largos períodos en zonas áridas y semiáridas, como así también con procesos naturales, como ser inundaciones, y también la erosión de las rocas, que liberan sales principalmente cloruros de sodio, calcio y magnesio y en menor medida sulfatos (Odeh and Onus, 2008). Además de los procesos naturales la salinización puede ser provocada por una fertilización excesiva o por el uso de agua de riego de mala calidad, denominándose a esta última salinización secundaria. Estos problemas de salinización secundaria son importantes en las zonas de regadío por uso de agua en exceso, ya sea por sistemas de riego poco específicos o por malas prácticas de riego.

En las zonas afectadas por salinidad, la principal solución ha sido la sustitución de cultivos sensibles por otros más tolerantes, para reemplazar cultivos tradicionales. Por otro lado,

las técnicas de lavado de suelos han reducido el problema en algunos países, pero los costos de esta tecnología no están siempre al alcance de todos (Shannon, 1997).

#### 1.7.1. Efectos del estrés salino en las plantas:

El principal efecto de la salinidad sobre las plantas es la reducción del crecimiento debido: a un efecto **osmótico** inducido por la disminución del potencial osmótico del medio; una **toxicidad específica**, asociada con la absorción excesiva de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  ; **un desequilibrio nutricional**, debido a la interferencia de los iones salinos con los nutrientes esenciales; y la combinación de todos los efectos anteriores. Como consecuencia de estos efectos primarios también se produce un **daño oxidativo** (Zhu, 2001).

##### 1.7.1.1. Daño osmótico:

Comienza inmediatamente después de que la concentración de NaCl en la rizosfera aumenta por encima del nivel de tolerancia de la planta, este efecto reduce el agua disponible para las raíces al disminuir el potencial hídrico del suelo, como consecuencia se inhibe el crecimiento, se reduce la división celular y disminuye el área foliar y la tasa fotosintética (Manchanda and Garg, 2008). En estas condiciones aumenta el número de raíces secundarias para la búsqueda de agua, aumentando la relación raíz/parte aérea.

##### 1.7.1.2. Daño iónico:

Además del daño osmótico, se incrementa en la planta la concentración de sales que provoca la acumulación de iones tóxicos -como  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en el apoplasto- que deshidratan la célula, en el citoplasma inhiben enzimas esenciales del metabolismo, y en el cloroplasto, ejercen un efecto directo sobre el proceso de fotosíntesis (Geissler *et. al.*, 2008). También se produce un desbalance nutricional por el impacto negativo que ejerce la presencia de  $\text{Na}^+$  celular o extracelular en la homeostasis de nutrientes esenciales como  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^+$  (Tejera *et. al.*, 2006).

1.7.1.3. Daño oxidativo:

Un aspecto secundario de la salinidad en plantas, es el estrés oxidativo inducido por la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), en las que se incluyen: peróxido de hidrógeno, radical superóxido, radical hidroxilo, ozono, entre otros.

Este daño oxidativo, se manifiesta por la alteración de biomoléculas fundamentales, como azúcares, lípidos, proteínas, DNA y vitaminas (Foyer and Noctor, 2005). Las EROs actúan a nivel de los residuos de aminoácidos fragmentando las proteínas o formando uniones entre ellas, a nivel de los ácidos grasos, que participan formando fosfolípidos de membrana, que regulan la fluidez de las mismas. Se observa la generación de peróxidos lipídicos, y a nivel del DNA, ocasionan ruptura de las cadenas, como también se pueden producir mutaciones al interaccionar estas con las EROs.

1.7.2. Efectos del estrés salino en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

El estrés salino puede afectar la simbiosis de manera indirecta, como ser: afectando la planta hospedadora o afectando determinados procesos fisiológicos de la planta, o directamente, inhibiendo el proceso de infección de los pelos radicales por rizobio y desarrollo del nódulo. Se ha observado que la salinidad inhibe los puntos de infección, como también disminuye el tamaño y la cantidad de nódulos (Zahran, 1999). En plantas de *Vicia faba* se ha observado una inhibición del cordón de infección, mientras que se han registrado estimulaciones en el crecimiento de nódulos en algunas leguminosas resistentes a salinidad, como en algunas especies de garbanzo y en algunas líneas de *Medicago truncatula* (Soussi *et. al.*, 1999). Cabe destacar, que las etapas iniciales de la nodulación son más sensibles al estrés salino que las posteriores (Cordovilla *et. al.*, 1999).



## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVO**

En función de los antecedentes citados se plantea como hipótesis de este trabajo que el conocimiento y manejo adecuado de las bacterias con efecto PGPR y sus formulaciones como inoculantes se traduce en un incremento en el rendimiento de los cultivos

El objetivo del presente trabajo es: evaluar el incremento en el rendimiento de cultivos de alfalfa mediante la acción de microorganismos PGPR aislados de zonas que estuvieron anegadas durante el tiempo necesario para la salinización de sus tierras

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. Selección de las zonas de muestreo y caracterización de los suelos

Para la selección de las zonas se tuvo en cuenta la región delimitada por la isohieta de los 600-700 mm de precipitación anual en el área de la Provincia de La Pampa, Argentina, la cual cumple con las condiciones edafoclimáticas requeridas en este trabajo. Se extrajeron muestras de suelo correspondientes a dos sitios (bajo salino y loma libre de sales) para cada zona delimitada, en proximidades de las localidades de: Metileo, Embajador Martini, Uriburu y Doblas.

Los muestreos se realizaron en dos épocas diferentes del año, entre abril y julio (primer muestreo) y entre septiembre y diciembre (segundo muestreo).

El análisis físico-químico de los suelos se realizó teniendo en cuenta las metodologías propuestas en “Análisis Químico de Suelos” (Jackson, 1976), realizándose las siguientes determinaciones: pH, conductividad, porcentaje de humedad, porcentaje de materia orgánica, porcentaje de nitrógeno y capacidad de intercambio catiónico (CIC).

#### 3.2. Microorganismos

A partir de plantas de alfalfa de la variedad Aurora G6 desarrolladas en tubos con medio Jensen (Vincent, 1970) (Tabla 2) en cámara climatizada con control de luz (16 horas) y temperatura (22-25°C) e inoculadas con diluciones de los suelos mencionados, se procedió después de 15 días, a la recolección de los nódulos.

Tabla N°2. Composición de medio Jensen (Vincent, 1970).

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad (g L<sup>-1</sup>)</u>
CaHPO <sub>4</sub>	1.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2
NaCl	0.2
FeCl <sub>3</sub>	0.1
Agar	10.0
	pH 6.5

Luego se realizó el aislamiento de las bacterias a partir de los nódulos, según la metodología propuesta por CIAT (1988).

De los aislamientos obtenidos, para este trabajo, se utilizaron 12 aislamientos nativos y como referencia la cepa de *Sinorhizobium meliloti*, recomendada por INTA – Castelar para la formulación de inoculantes, denominada B399 y provista por el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA) de dicha institución.

Los aislamientos se conservaron en medio YEM (yeast extract, manitol) (Vincent 1970) (Tabla 3), en tubos con agar inclinado, en heladera a 5°C.

Tabla N°3. Composición de medio YEM (Vincent 1970).

<u>Componente</u>	<u>Concentración (g L<sup>-1</sup>)</u>
Manitol	10,0
Extracto de levadura	0,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
NaCl	0,1
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O (solución 10% )	1 gota
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O (solución 10% )	1gota
Rojo Congo (solución 0,25%)	5 ml
Agar	15,0
	pH 6,8

### 3.3. Semillas

Se utilizaron semillas de alfalfa del cultivar Aurora perteneciente al Grupo 6 y producida en el criadero Morgan (datos del proveedor Agrotec S.A. de Santa Rosa, La Pampa).

### 3.4. Ensayo en cámara climatizada

Este ensayo se realizó con el objeto de determinar parámetros de efectividad simbiótica de algunos aislamientos seleccionados mediante electroforesis de isoenzimas.

Se utilizaron semillas de alfalfa, las que previo a la siembra 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<sub>2</sub>O destilada estéril en un vaso de precipitado estéril y posteriormente, 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 hacerlas germinar a una temperatura de 28°C, en oscuridad.

En el momento en que las semillas desarrollaron aproximadamente 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 de 2.5 cm de diámetro por 20 cm de altura, previamente preparados con medio Jensen (Tabla 2) y esterilizados, quedando la radícula debajo del agar.

Los tubos se colocaron en soportes de madera de modo que la superficie del agar coincidiera con el borde del mismo, para proteger a las raíces de la luz. Se brindó 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 10). 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 (Vincent, 1970).



Figura 10. Ensayo en cámara climatizada.

Los tratamientos realizados fueron:

T) Testigo sin inocular.

N) Testigo suplementado con nitrógeno (según requerimientos de alfalfa:  $\text{KNO}_3$  0.05% incorporados al medio Jensen).

B399) Inoculado con la cepa de referencia B399.

- 1) Inoculado con el aislamiento UB5<sup>1</sup>
- 2) Inoculado con el aislamiento UR2<sup>1</sup>
- 3) Inoculado con el aislamiento UL1<sup>1</sup>
- 4) Inoculado con el aislamiento ML6<sup>1</sup>
- 5) Inoculado con el aislamiento MB4<sup>1</sup>
- 6) Inoculado con el aislamiento MR6<sup>1</sup>
- 7) Inoculado con el aislamiento DB4<sup>1</sup>
- 8) Inoculado con el aislamiento DR2<sup>2</sup>
- 9) Inoculado con el aislamiento DB1<sup>1</sup>
- 10) Inoculado con el aislamiento EMB1<sup>2</sup>
- 11) Inoculado con el aislamiento EMR4<sup>2</sup>
- 12) Inoculado con el aislamiento EMLR9<sup>1</sup>

Para indicar el lugar de procedencia, se utilizaron letras mayúsculas atendiendo al nombre de cada zona:

Uriburu: U - Doblas: D - Metileo: M - Embajador Martini: EM

El sitio se indicó:

L: Loma - B: Bajo - R: Suelo Rizosférico

Se utilizaron superíndices para indicar si se trataba del primer (1) o del segundo muestreo (2).

Así por ej: MR6<sup>1</sup> (Metileo, Suelo Rizosférico 6, 1° Muestreo)

Se realizaron diez repeticiones de cada tratamiento, abarcando el ensayo 150 tubos en total, con dos plantas por tubo. La ubicación en los soportes de madera fue totalmente

aleatoria e incluso durante el ensayo se fueron rotando. Las inoculaciones fueron realizadas 48 horas después de implantar la semilla en el tubo agregando a cada uno 1ml de la suspensión bacteriana desarrollada en el Medio Proceso de Tabla 4 y cuya concentración era del orden de  $10^9$  células viables  $\text{ml}^{-1}$ .

A partir de la segunda semana y hasta la octava 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 regó con agua destilada estéril dos veces por semana.

Tabla N°4. Composición de medios de cultivo para *S. meliloti* (Balatti and Jardim Freire, 1996).

<u>Componente</u>	<u>Concentración Medio Mantenimiento (<math>\text{g L}^{-1}</math>)</u>	<u>Concentración Medio Inóculo (<math>\text{g L}^{-1}</math>)</u>	<u>Concentración Medio Proceso (<math>\text{g L}^{-1}</math>)</u>
Sacarosa	-	5,0	10,0
Ext de Levadura	2,0	2,0	4,0
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,5	0,5	0,5
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,5	0,5	0,5
NaCl	0,1	0,1	0,1
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}^*$	2 gotas	2 gotas	2 gotas
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}^*$	2 gotas	2 gotas	2 gotas
$\text{KNO}_3$	0,8	0,8	0,8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2	0,2	0,2
Manitol	5,0	-	-
Agar	14	-	-
	pH 6,8	pH 6,8	pH 6,8

\*(solución 10%)

Transcurridas ocho semanas, cuando los testigos sin inocular mostraban signos de senescencia en sus hojas, se separó parte aérea y se seco en estufa con circulación de aire a 60°C hasta peso constante, a fin de determinar materia seca y con 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 y utilizando la fórmula que más abajo se detalla, se determinó el índice de eficiencia relativa (I.E.R), el cual es un parámetro agronómicamente importante cuando se realiza la selección de aislamientos de rizobios para determinar, en una primera etapa, si los mismos pueden considerarse potenciales para futuros productos biotecnológicos. Se debe tener en cuenta que si el valor obtenido supera el 70%, se considera ese aislamiento como promisorio.

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

La parte aérea seca de cada planta se sometió a molienda para determinar el porcentaje de nitrógeno y proteínas por el método de Kjeldahl (Baker and Thompson, 1992) utilizando, en este caso, un equipo Tecator, Kjeltex Auto 1030 Analyzer.

La primer etapa en el método de Kjeldahl consiste en una digestión ácida, para ello se colocaron 100 mg de la muestra molida y 1.25 g de catalizador (24 g de sulfato de potasio y 1 g de óxido mercúrico amarillo) 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 digesta (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.

En la segunda etapa del método, la destilación y titulación se realizó 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 posteriormente 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.

### **3.5. Caracterización de los aislamientos**

La caracterización de los microorganismos aislados se realizó por:

3.5.1. Morfología de las colonias: Sembrados los aislamientos en placas de Petri con medio YEM (Tabla 3) y transcurrido el tiempo necesario para observar crecimiento se evaluó: absorción de colorante Rojo Congo, cantidad de goma producida, textura, forma y apariencia de las colonias, según metodología para caracterización de rizobios propuesta por CIAT (1988).

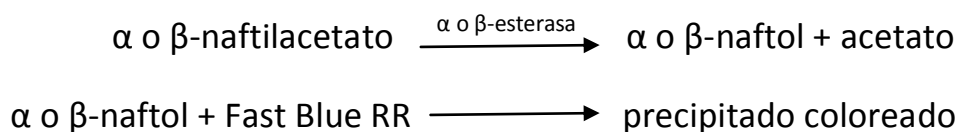
3.5.2. Observación microscópica: para esto se utilizó un microscopio binocular modelo Janamed 2 Carl Zeiss Jena óptica planométrica con contraste de fases, con aumento de 100X, luz verde.

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

3.5.4. Electroforesis de isoenzimas (MLEE): cada aislamiento fue desarrollado durante 24 horas en medio TY (3 g extracto de levadura, 5 g triptona y 0,87 g de  $\text{CaCl}_2$  por litro de medio, pH 7,2; Beringer, 1974), luego 10 ml aproximadamente fueron centrifugados en Centrífuga Rolco CR 5150 a 7500 rpm y 4°C, durante 30 minutos. El pellet así obtenido fue resuspendido en 1ml de solución 0,85% de NaCl. Posteriormente la suspensión fue centrifugada a 15000 rpm, utilizando centrífuga EPPENDORF 5414 durante 10 minutos, y el pellet obtenido fue lavado con buffer 0,1 M de Tris-HCl pH 7,2, conteniendo 5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 15% de glicerol y 0.1%  $\beta$ -mercaptoetanol. Luego del lavado, las bacterias fueron nuevamente sedimentadas por centrifugación y resuspendidas en 0,5 ml del mismo buffer, 0,1 M Tris-HCl pH 7,2, conteniendo 1 mg  $\text{ml}^{-1}$  de lisozima. La suspensión fue incubada a temperatura ambiente por 10 minutos, transcurridos los cuales



se centrifugó nuevamente. El sedimento fue resuspendido en buffer de sonicación (0,1 M Tris- HCl pH 8,8, conteniendo 15% de glicerol) y sometido a la acción de 6 pulsos de sonicador KONTES Microsonic Cell Disrupter, de 30 segundos cada uno. La suspensión fue entonces centrifugada, el sobrenadante separado y almacenado a -18°C, para su posterior análisis electroforético (Lemos *et. al.*, 1994). Se realizó Electroforesis en Geles de Poliacrilamida (PAGE) para separar las isoenzimas presentes en los extractos obtenidos. La concentración de poliacrilamida para la placa de electroforesis fue de 5% para el gel concentrador y 10% para el gel separador (Tabla 5). Se colocó la placa de electroforesis en la cuba conteniendo solución reguladora de electrodos (0,012M Tris; 0,095M Glicina; pH 8,8). Teniendo en cuenta la determinación de proteínas realizada por el Método de Bradford (Bradford, 1976), se sembró un volumen de entre 50 y 80  $\mu$ l de extracto para asegurar el mismo contenido de proteínas en cada calle. La electroforesis se corrió con un voltaje constante de 200 V, utilizándose azul de bromofenol como indicador del frente de corrida. Las enzimas fueron detectadas en el gel de acuerdo al método adaptado en el laboratorio del Departamento de Química; los geles fueron tratados con 100 ml de buffer fosfatos 0,1 M pH 6,2, conteniendo 100 mg de Fast Blue RR y 60 mg de  $\alpha$ -naftil acetato y 40 mg de  $\beta$ -naftil acetato, previamente disueltos en 0,5 ml de acetona y luego incubados a temperatura ambiente con agitación lenta y continua, hasta que desarrollaron suficiente coloración en las bandas, aproximadamente 30 minutos.



Luego se lavaron los geles con 300 ml de solución decolorante (30% v/v de etanol, 5% v/v de ácido acético, 65% v/v de agua). Los geles fueron fotografiados y posteriormente se analizaron los perfiles isoenzimáticos mediante dendrogramas construidos por el método UPMGA (utilizando el programa Ntsys versión 1.70).

Tabla N°5. Concentración de los geles de poliacrilamida.

	<u>Gel concentrador 5%</u>	<u>Gel separador 10%</u>
Tris-HCl 2,25 M, pH 8,8;	2 ml	4,35 ml
Acrilamida–bisacrilamida 30:0,8%	1,33 ml	11,31 ml
Agua desionizada	4,62 ml	9,45 ml
TEMED	20 $\mu$ l	40 $\mu$ l
Persulfato de amonio	100 $\mu$ l	300 $\mu$ l

3.5.5. Desarrollo en medio líquido y determinación de parámetros cinéticos de crecimiento: primeramente se hicieron crecer cada uno de los aislamientos seleccionados y la cepa B399, durante 24 horas, en el medio inóculo (Tabla 4) contenido en un erlenmeyer de 250 ml, con 50 ml de medio, colocado en agitador rotatorio de 250 rpm y 2,5 cm de excentricidad, en cuarto estufa a 28°C.

Luego se transfirieron 10 ml de la suspensión de microorganismos del inóculo al medio proceso contenido en un frasco erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de medio. Se continuó el desarrollo en las condiciones citadas durante 48 horas, determinándose el crecimiento celular indirectamente, en base a determinaciones de densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, cada 3 horas, (se hizo uso de un espectrofotómetro METROLAB 1700-UV-Visible) utilizándose agua destilada como blanco y realizando las determinaciones en celdas de vidrio, sobre las muestras sin modificar, o realizando diluciones, cuando fue necesario. Paralelamente se determinó pH y se realizaron observaciones microscópicas para descartar posibles contaminaciones.

Se determinaron los siguientes parámetros cinéticos: velocidad específica de crecimiento ( $\mu$  máx) a partir de la curva de ln UDO en función del tiempo del proceso y tiempo de generación (tg) a partir de  $\mu$  ( $tg = \ln 2 \mu^{-1}$ ).

3.5.6. Crecimiento de los microorganismos a distintas concentraciones de NaCl: Para ello se sembraron diluciones de la suspensión de microorganismos en el medio YEM

(Vincent, 1970) (Tabla 3) y sus correspondientes modificaciones en la concentración de cloruro de sodio, reemplazando la concentración original de  $0,1\text{gL}^{-1}$  ( $1,71\text{mM}$ ) por:  $0\text{gL}^{-1}$ ;  $5\text{gL}^{-1}$ ;  $15\text{gL}^{-1}$ ; y  $25\text{g L}^{-1}$  (que corresponden a  $0\text{mM}$ ,  $85,5\text{mM}$ ,  $256\text{mM}$  y  $427\text{mM}$ ) hasta obtener un crecimiento considerable y poder realizar el recuento de los microorganismos o en su defecto observar crecimiento o no (Ghittoni and Bueno, 1996).

### 3.5.7. Determinaciones genéticas por las técnicas de PCR

Para ello se realizaron las siguientes experiencias:

*-Extracción de DNA total del rizobio:* A partir de cultivo sólido, se tomaron bacterias con la punta de un tip y se resuspendieron en  $100\ \mu\text{l}$  de sarcosyl 0,1% en TE ( $10\ \text{mM}$  Tris,  $1\ \text{mM}$  EDTA) en microtubo de polipropileno, se centrifugaron durante 2 minutos a  $10000\ \text{rpm}$  y se descartó el sobrenadante. A continuación el sedimento se resuspendió en  $1\ \text{ml}$  de NaCl  $1\ \text{M}$ , se centrifugó nuevamente durante 2 minutos a  $10000\ \text{rpm}$  y se descartó el sobrenadante. Luego al precipitado se adicionaron  $250\ \mu\text{l}$  de TE conteniendo  $20\ \%$  de sacarosa más  $250\ \mu\text{l}$  de TE conteniendo  $5\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  de lisozima, se incubó 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  y se agregaron  $50\ \mu\text{l}$  de una solución de TE conteniendo  $0,3\%$  de sarcosyl y  $10\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  de proteinasa K, se agitó por inversión y se incubó durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente se procedió a la unión del DNA a la sílica, para lo cual se agregó  $10\ \mu\text{l}$  de suspensión de sílica ( $2\ \text{g}$  de sílica en  $15\ \text{ml}$  de agua, se lava 3 veces centrifugando a  $2000\ \text{rpm}$ , se estima por pesada el volumen de sílica y se resuspenden en dos volúmenes de agua) y se mezcló. Se sedimentó la sílica por centrifugación durante 10 segundos a máxima velocidad, se descartó el sobrenadante y se lavó la sílica 3 veces con  $500\ \mu\text{l}$  de solución de lavado ( $50\ \text{mM}$  NaCl,  $10\ \text{mM}$  Tris,  $2,5\ \text{mM}$  EDTA), se resuspendió completamente, se centrifugó 10 segundos y se descartó el sobrenadante en cada uno de los lavados. Luego para eluir el DNA de la sílica se resuspendió el precipitado en  $25\ \mu\text{l}$  de agua bidestilada, se calentó 5 min a  $60^\circ\text{C}$  y se centrifugó 2 min a máxima velocidad. Se tomó el sobrenadante conteniendo el DNA del tratamiento realizado (Pistorio, 2001).

*-Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):* Los ensayos de PCR fueron realizados empleando un ciclador térmico MyCycle (BioRad). La composición de las mezclas de reacción utilizadas para cada tratamiento fue:  $2,5\ \mu\text{l}$  de buffer ( $50\ \text{mM}$  Tris-HCl, pH 8,3);

1,25 µl de MgCl<sub>2</sub> 3 mM; 2,5 µl de dNTPs 200 µM; 0,2 µl de la enzima Taq DNA polimerasa, 2,5 µl de cada uno de los cebadores (Tabla 6) 10 µM; 8,55 µl de H<sub>2</sub>O y 5 µl del DNA obtenido. Las condiciones de ciclado para la amplificación utilizadas fueron las siguientes: una etapa de desnaturalización inicial de a 25°C durante 1 minuto; 40 ciclos de: desnaturalización a 95°C durante 20 segundos, *annealing* a 53°C durante 20 segundos y elongación a 72°C durante 30 segundos. Como etapa final se incubó la muestra a 72°C durante 1 minuto (Pistorio, 2001).

Tabla N° 6. Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados en reacciones de PCR

<u>Denominación</u>	<u>Secuencia</u>
Y1	5`-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3`
Y2	5`-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3`

*-Electroforesis en gel de agarosa:* Finalizada la reacción de PCR, 5 µl de cada uno de los productos obtenidos fueron sembrados en un gel de agarosa 0,8 % (P/V) conteniendo bromuro de etidio. La electroforesis se realizó con un voltaje constante de 60V y utilizando TBE 0,5X, como solución reguladora de electrodos. Se utilizó como solución de siembra sacarosa 40% y azul de bromofenol 0,25%. El perfil de bandas obtenido fue observado y posteriormente fotografiado bajo iluminación ultravioleta.

*-Identificación de los aislamientos por medio de secuenciación de 16S:* el producto de PCR fue secuenciado utilizando un analizador DNA 3730xl, por Macrogen Inc. (Korea).

### **3.6. Ensayo en Invernadero.**

Para la evaluación de la simbiosis se compararon los resultados de los parámetros obtenidos al inocular las plantas de alfalfa con la cepa de referencia, *S. meliloti* B399, y con tres aislamientos nativos obtenidos durante este trabajo, siguiendo la metodología detallada en el inciso 3.4.

3.6.1. Condiciones experimentales: se utilizaron semillas de alfalfa del cultivar Aurora perteneciente al Grupo 6, las cuales se esterilizaron y se colocaron a germinar a 28°C, en oscuridad, según metodología indicada en 3.4.

El suelo fue esterilizado en autoclave a 121°C y 1 atm de presión, con dos ciclos de 30 minutos, para eliminar todos los posibles microorganismos y colocado en macetas plásticas de 10 cm de diámetro por 50 cm de alto. En cada maceta, que contenía 4,0 Kg de suelo, se implantaron 4 semillas pregerminadas como se indicó anteriormente, sobre el suelo húmedo. El diseño fue completamente al azar, con 6 repeticiones. Los tratamientos que se llevaron a cabo fueron: 1. Testigo; 2. Testigo Fertilizado con Nitrógeno; 3. Inoculado con la cepa B399; 4. Inoculado con el aislamiento ML6; 5. Inoculado con el aislamiento MR6 y 6. Inoculado con el aislamiento MB4. La inoculación con las suspensiones bacterianas desarrolladas en medio para *S. meliloti* (Balatti and Jardin Freire, 1996), se realizó a las 48 horas de implantado el ensayo. Después de dos semanas se seleccionaron las dos plántulas más vigorosas y las restantes fueron desechadas. Para la fertilización nitrogenada se utilizó solución de urea 7,88 g L<sup>-1</sup>, la cual se aplicó en 5 dosis de 5 ml cada una, sucesivamente cada 15 días desde el momento de la siembra, de modo de completar una dosis acumulada de 150 Kg N Ha<sup>-1</sup> (Vincet, 1970). Durante el tiempo que duró el ensayo, se mantuvo la humedad constante mediante riegos periódicos con agua destilada. Las macetas se rotaron frecuentemente, para asegurar homogeneidad de condiciones en la totalidad de los tratamientos. Se colocaron guías de alambre para permitir que las plantas se sujetaran a ellas. Transcurridos 4 meses de la siembra se cosecharon las plantas, cortando los tallos al nivel del suelo.

3.6.2. Parámetros de efectividad simbiótica: se determinó peso seco de parte aérea, secada en estufa a 60°C (hasta peso constante, aproximadamente 48 horas), porcentaje de nitrógeno y porcentaje de proteínas (multiplicando el porcentaje de nitrógeno por factor de conversión 6,25) (idem inciso 3.4).

### 3.7. Ensayo a campo

Para la evaluación de la simbiosis, se compararon los resultados de los parámetros obtenidos al inocular las plantas de alfalfa con la cepa de referencia, *S. meliloti* B399, y con tres aislamientos nativos obtenidos durante este trabajo.

3.7.1. Condiciones experimentales: el ensayo fue realizado en Metileo (S 35° 47,487 W 63° 56,728), durante los meses de abril de 2011 a febrero de 2012.

Se utilizaron semillas de alfalfa del cultivar Aurora perteneciente al Grupo 6.

Antes de realizar la siembra, se pesó la cantidad de semillas correspondientes para cada uno de los tratamientos (teniendo en cuenta lograr una densidad 20 Kg Ha<sup>-1</sup>) y se las colocó en bolsas plásticas. Posteriormente fueron impregnadas con la suspensión de microorganismos desarrollados en medio para *S. meliloti* (Balatti and Jardim Freire, 1996), 24 horas antes de realizar la siembra. Las suspensiones correspondían a cultivos de las bacterias: B399, ML6, MR6 y MB4 crecidos en medio para *S. meliloti* (Balatti and Jardim Freire, 1996) durante 48 horas en agitador rotatorio de 250 rpm y 2,5 cm de excentricidad. Los tratamientos que se llevaron a cabo fueron: 1. Testigo; 2. Testigo Fertilizado con Nitrógeno 3. Inoculado con la cepa B399; 4. Inoculado con el aislamiento ML6; 5. Inoculado con el aislamiento MR6 y 6. Inoculado con el aislamiento MB4.

Para dicho ensayo se utilizó un diseño de bloques al azar, con 6 réplicas cada uno, para lo cual se dispuso de una parcela de 10m de ancho x 25m de largo. Se construyeron 6 bloques de 18m<sup>2</sup> cada uno, con 6 parcelas de 3m de largo x 1m de ancho (Figura 11). En cada parcela se delimitaron 6 surcos equidistantes de 3m de largo. Para la fertilización nitrogenada se utilizó urea en una dosis de 100 Kg N Ha<sup>-1</sup> (Vincet, 1970) y en una única aplicación.

3.7.2. Parámetros de efectividad simbiótica: peso seco de parte aérea, porcentaje de nitrógeno y porcentaje de proteínas (multiplicando el porcentaje de nitrógeno por el factor de conversión: 6,25).

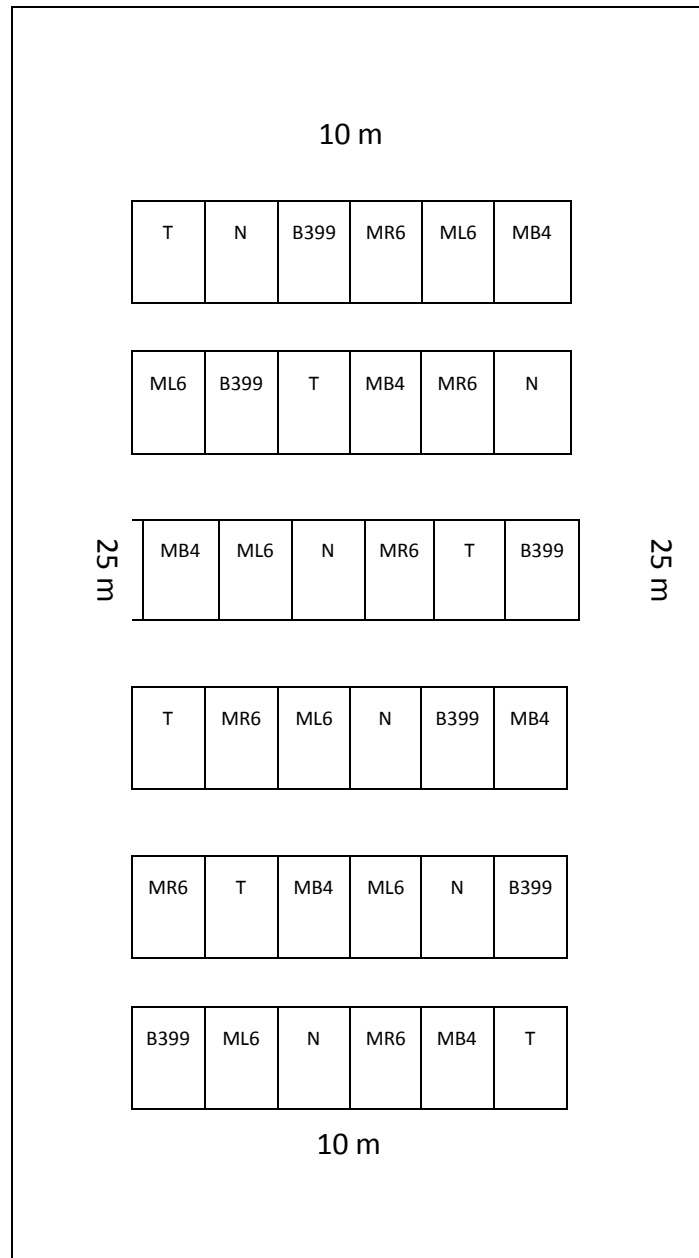


Figura 11. Esquema de la distribución de los tratamientos en el ensayo a campo

### 3.8. Tratamiento estadístico

El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante Test de Comparación de Medias D.G.C., utilizando la versión 1.1/Profesional de InfoStat. (Di Rienzo *et al.*, 2002).

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

##### 4.1. Selección de las zonas de muestreo y caracterización de los suelos

De acuerdo a lo indicado en Materiales y Métodos se realizaron muestreos de suelo en la región comprendida por la isohieta de los 600 y 700 mm de precipitación anual. Se seleccionaron cuatro localidades (Metileo, Embajador Martini, Uriburu y Doblas) Figura 12. En la Tabla 7, se indican las coordenadas de los lugares donde se recolectaron los suelos. Se trabajó con muestras complejas, tomadas al azar de tres lugares diferentes. Para cada zona se muestreo la loma y el bajo en dos épocas diferentes del año: entre Abril y Julio (primer muestreo), y entre Septiembre y Diciembre (segundo muestreo).

Tabla N° 7. Coordenadas de las zonas de muestreo.

##### **Metileo**

Loma S 35° 47,871 - W 63° 56,708  
Bajo S 35° 47,487 - W 63° 56,728

##### **Embajador Martini**

Loma S 35° 26,737 - W 64° 15,184  
Bajo S 35° 26,726 - W 64° 15,605

##### **Uriburu**

Loma S 36° 31,724 - W 63° 54,646  
Bajo S 36° 31,326 - W 63° 54,213

##### **Doblas**

Loma S 37° 12,131- W 64° 01,868  
Bajo S 37° 12,982 - W 64° 01,627

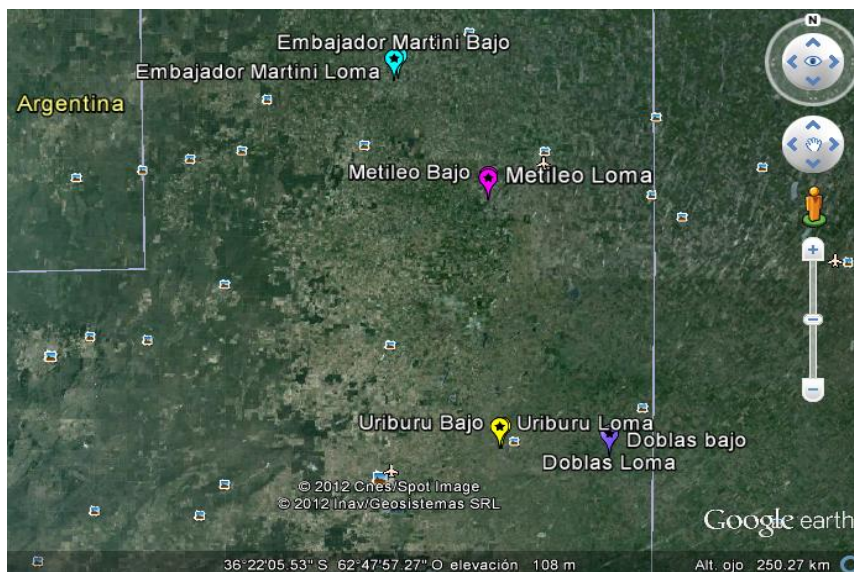


Figura 12. Imagen de las zonas de muestreo tomadas del programa Google Earth.



Los suelos fueron caracterizados por análisis físico-químico, cuyos resultados se observan en la Tabla 8.

Tabla N° 8. Análisis físico-químico de los suelos.

Lugar	pH Hidrolítico		Conductividad (mS/cm)		% Humedad		Materia orgánica		Nitrógeno (g/100g)		CIC (meq/100g)	
	1º Muestreo	2º Muestreo	1º Muestreo	2º Muestreo	1º Muestreo	2º Muestreo	1º Muestreo	2º Muestreo	1º Muestreo	2º Muestreo	1º Muestreo	2º Muestreo
Metileo Loma	7,27	6,8	0,022	0,084	1,23	1,38	1,68	2,01	0,05	0,06	5,06	5,14
Metileo Bajo	8,64	8,79	0,09	0,456	1,11	1,51	1,95	1,67	0,12	0,18	5,97	5,89
Doblas Loma	7,06	7,14	0,012	0	0,43	0,57	1,57	1,05	0,07	0,11	2,95	2,92
Doblas Bajo	9,3	8,76	0,796	0,286	1,46	1,02	3,33	1,82	0,1	0,05	8,29	5
Embajador Martini	7,09	7,19	0,061	0,03	1,19	1,6	2	1,15	0,05	0,07	5,5	5,73
Embajador Martini	7,53	7,56	0,926	1,448	1,49	2,93	2,46	2,05	0,16	0,17	7,68	10,8
Uriburu Loma	6,89	6,9	0,025	0,038	1,08	1,42	2,59	2,25	0,09	0,15	5,31	5,3
Uriburu Bajo	10,27	8,86	1,727	0,133	0,86	2,1	1,49	2,56	0,15	0,18	6,08	7,6

Analizando la Tabla 8, se observa que existen diferencias en los pH de las muestras de los suelos de la loma (7,27-6,8) respecto a las muestras de los suelos del bajo (7,53-10,27), correspondiendo los primeros a suelos neutros y los últimos a suelos medianamente básicos-alcalinos (Porta Casanellas *et. al.*, 2003)

Todas las zonas de la loma presentan valores de conductividad entre 0,012 y 0,084 mS.cm<sup>1</sup>, mientras que en las zonas bajas encontramos valores más elevados, los que están en relación directa con el contenido de sales de los mismos (Porta and Herrero, 1996), clasificándose éstos desde ligeramente salinos a fuertemente salinos en algunos casos (Porta Casanellas *et. al.*, 2003).

En cuanto a los requerimientos nutricionales para el desarrollo de alfalfa, se evidencia una carencia importante en el contenido de nitrógeno, ya que el porcentaje óptimo es de 4,5% a 5 % para el desarrollo de los primeros 15 cm de parte aérea de alfalfa. Sin embargo, éste déficit puede suplirse gracias a la asociación simbiótica con bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Sinorhizobium* (Basigalup and Rossanigo, 2007).

## 4.2 Microorganismos

El aislamiento de los microorganismos se realizó a partir de las muestras de suelos de cada zona (según apartado 3.2 de Materiales y Métodos) utilizando el método de la planta trampa (Vincent 1970).

Transcurridas 4 semanas se levantó el ensayo, se extrajeron los nódulos (un total de 80), se esterilizaron y se aislaron las bacterias en cajas de Petri con medio YEM (Tabla 3). Las cajas de Petri se incubaron a 28°C por un período de entre 5 y 7 días, hasta aparición de colonias rosadas, características de rizobios.

Se obtuvieron un total de 53 aislamientos: 16 de Metileo, 15 de Embajador Martini, 15 de Uriburu y 7 de Doblas, identificados como se indica en la Tabla 9. Todos los aislamientos fueron conservados en tubos pico flauta, con medio YEM (Tabla 3) en heladera a una temperatura de 5°C.

Tabla N° 9. Aislamiento de microorganismos

<i>Suelos</i>	<i>Aislamientos</i>
Metileo	MB1, MB4, MB6, MB9, MB10, ML4, ML5, ML6, ML8, ML9, MR2, MR4, MR6, MR7, MR10, MR11
Embajador Martini	EMB1, EMB2, EMB3, EMB4, EMB5, EMB7, EMB9, EMB10, EML3, EML5, EMRL3, EMLR7, EMLR9, EMRL10, EMLR11,
Uriburu	UB1, UB2, UB3, UB5, UB6, UB10, UB11, UB12, UB13, UL1, UL4, UL5, UL6, UR2, UR3
Doblas	DB1, DB4, DB7, DB8, DR2, DR3, DR6

### 4.3. Ensayo en cámara climatizada

#### 4.3.1. Elección de los aislamientos

La elección de los aislamientos nativos a utilizar en este ensayo se realizó a partir del análisis del perfil de isoenzimas obtenidos en geles de poliacrilamida (M.L.E.E.) de los 53 aislamientos. A modo de ejemplo en la Figura 13 se muestran dos geles.

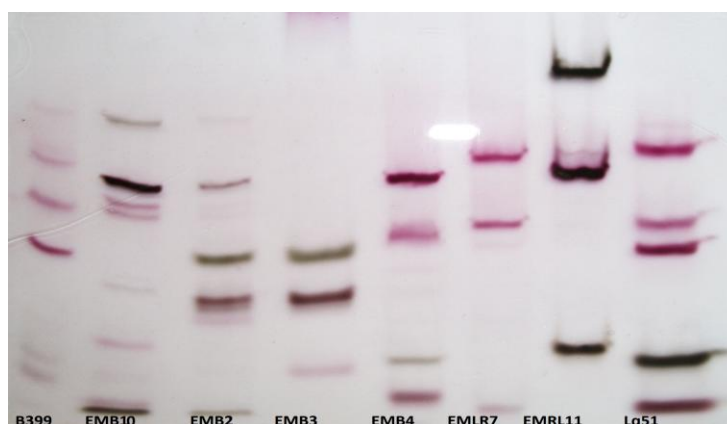
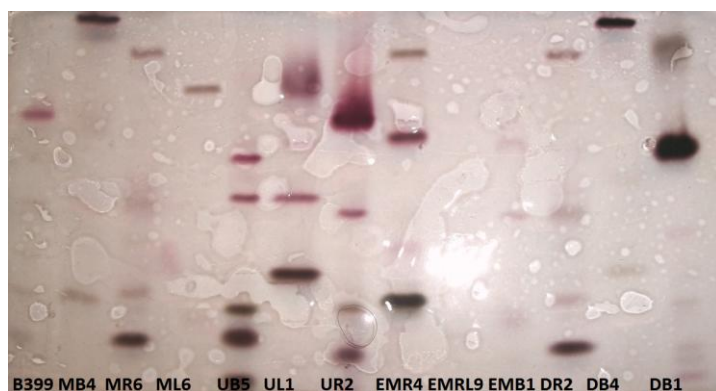


Figura 13. Zimogramas revelados para  $\alpha$  y  $\beta$  esterasa.

La electroforesis permitió distinguir si el perfil de isoenzimas para  $\alpha$  y  $\beta$  esterasa de los aislamientos nativos eran diferentes entre sí y respecto de la cepa de referencia (B399).

De todos los aislamientos analizados, se decidió trabajar con tres de cada zona: MB4, ML6 y MR6; EMB1, EMLR9 y EMR4; UB5, UL1 y UR2; DB4, DB1 y DR2.

El criterio que se siguió, fue el de elegir aquellos que presentaban una mayor actividad  $\alpha$  y  $\beta$  esterásica, un gran polimorfismo y una alta intensidad de bandas, lo que es deseable para su caracterización y seguimiento.

#### 4.3.2. Análisis cualitativo

Durante la realización del ensayo y en su finalización a los 56 días, se realizaron observaciones periódicas con el objeto de evaluar el desarrollo de las plantas (Figura 14) y la formación de nódulos (Figura 15), las que se representa en la Tabla 9.

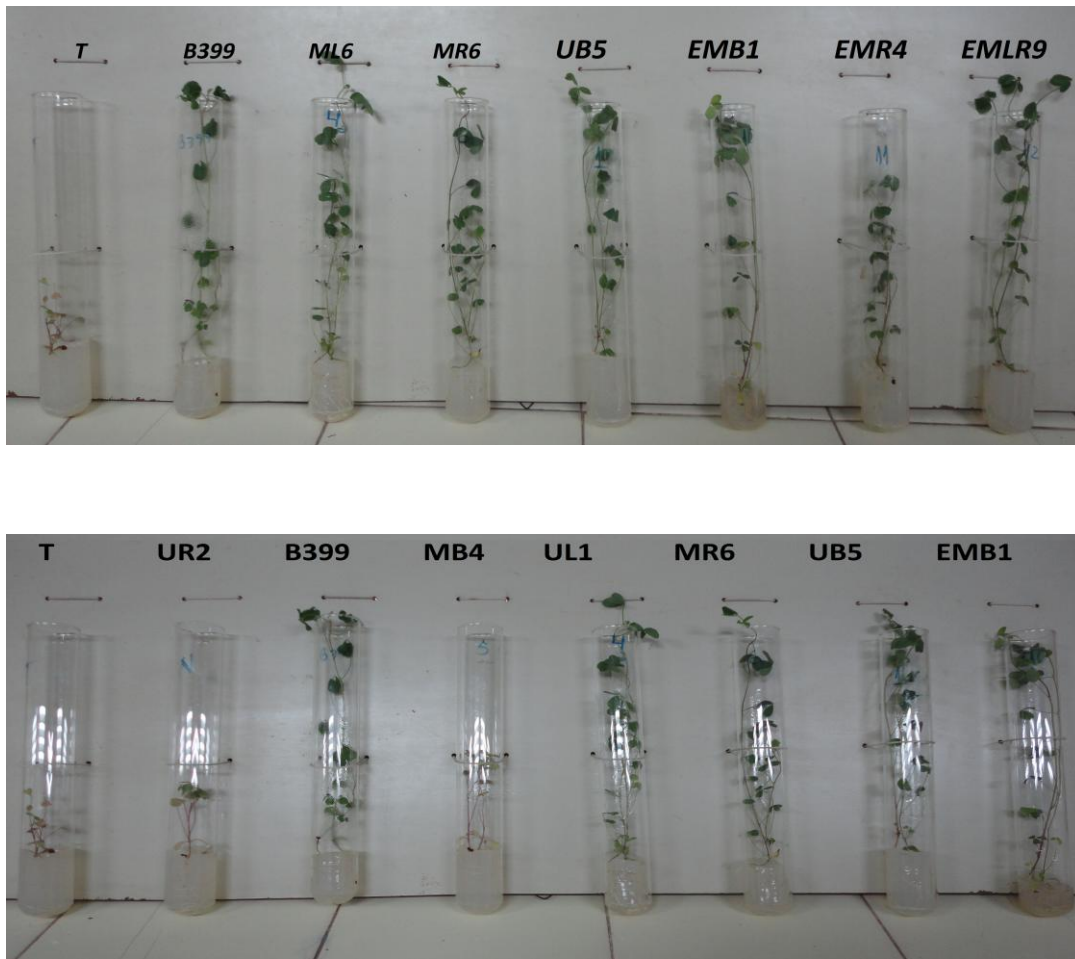


Figura 14. Comparación de las plantas de alfalfa inoculadas con los aislamientos nativos obtenidos en el ensayo en cámara climatizada.

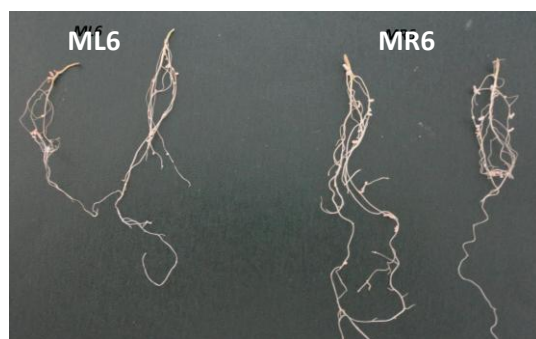


Figura 15. Raíces con sus respectivos nódulos de dos aislamientos nativos

Tabla N°10. Evaluación de los tratamientos en forma cualitativa

Tratamientos	Presencia de Nódulos*	Cantidad de nódulos **	Tamaño de las plantas***	Color de las plantas
UL1	+	++++	++++	Verdes
UR2	+	+	+	Amarillentas
UB5	+	++++	++++	Verdes
DB4	+	+	++	Amarillentas
DR2	+	++++	++++	Verdes Oscuras
DB1	+	+	+	Amarillentas
ML6	+	++++	++++	Verdes Oscuras
MR6	+	+++	+++	Verdes
MB4	+	+	+	Amarillentas
EMLR9	+	++++	++++	Verdes Oscuras
EMR4	+	++++	++++	Verdes
EMB1	+	++++	++++	Verdes

\*(+ mostraron nodulación; - no mostraron nodulación).

\*\*(++++ muchos; + pocos).

\*\*\*(++++ grandes; + pequeñas).

Como se puede observar, todos los aislamientos mostraron nodulación, pero no lo hicieron en la misma medida, y además existe una relación entre cantidad de nódulos, tamaño y aspecto de las hojas.

### 4.3.3. Parámetros evaluados

#### 4.3.3.1. Peso Seco

En la Figura 16 se representa el peso seco de los diferentes tratamientos.

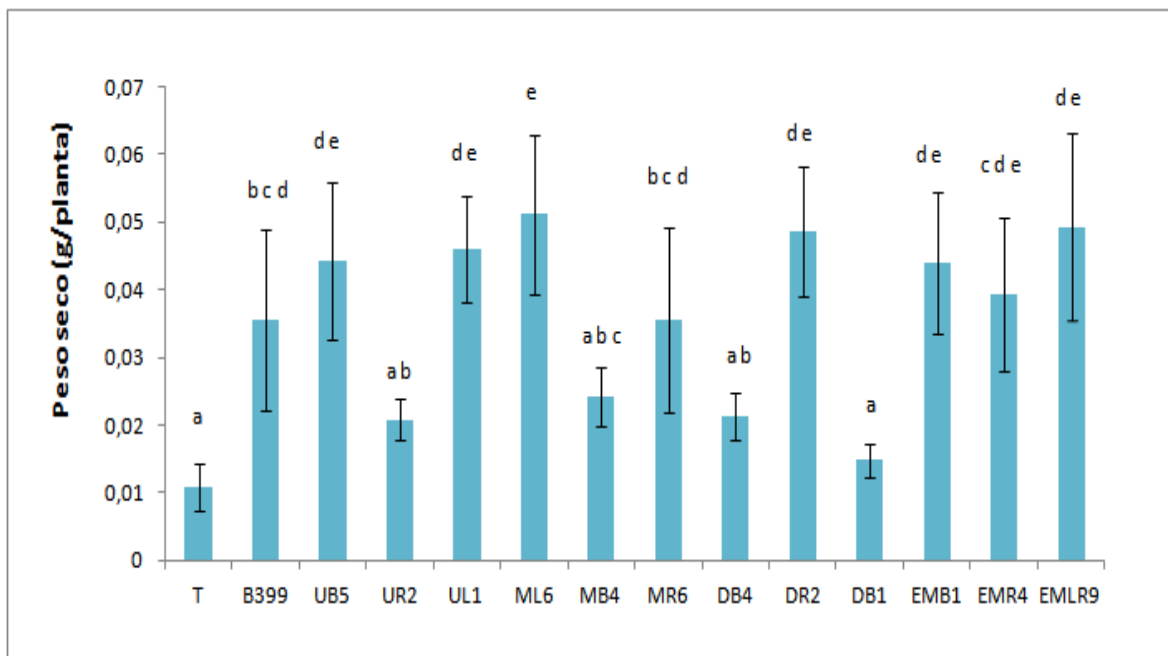


Figura 16. Peso seco de los tratamientos del ensayo en cámara climatizada.

*\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )*

Por medio del test estadístico D.G.C ( $p < 0,05$ ) se analizaron los resultados, con las siguientes consideraciones:

Existen diferencias significativas entre los valores medios de peso seco por planta de los tratamientos inoculados (UB5, UL1, ML6, MR6, DR2, EMB1, EMR4 y EMLR9) con el testigo sin inocular (T), y sólo uno de los aislamientos (ML6) presenta diferencias significativas con la cepa B399.

(\*Nota: Durante el ensayo se secó el tratamiento nitrogenado por lo que no se tuvo en cuenta para el análisis estadístico).

#### 4.3.3.2. Contenido de Nitrógeno total

En la Figura 17 se representa el porcentaje de nitrógeno de los diferentes tratamientos.

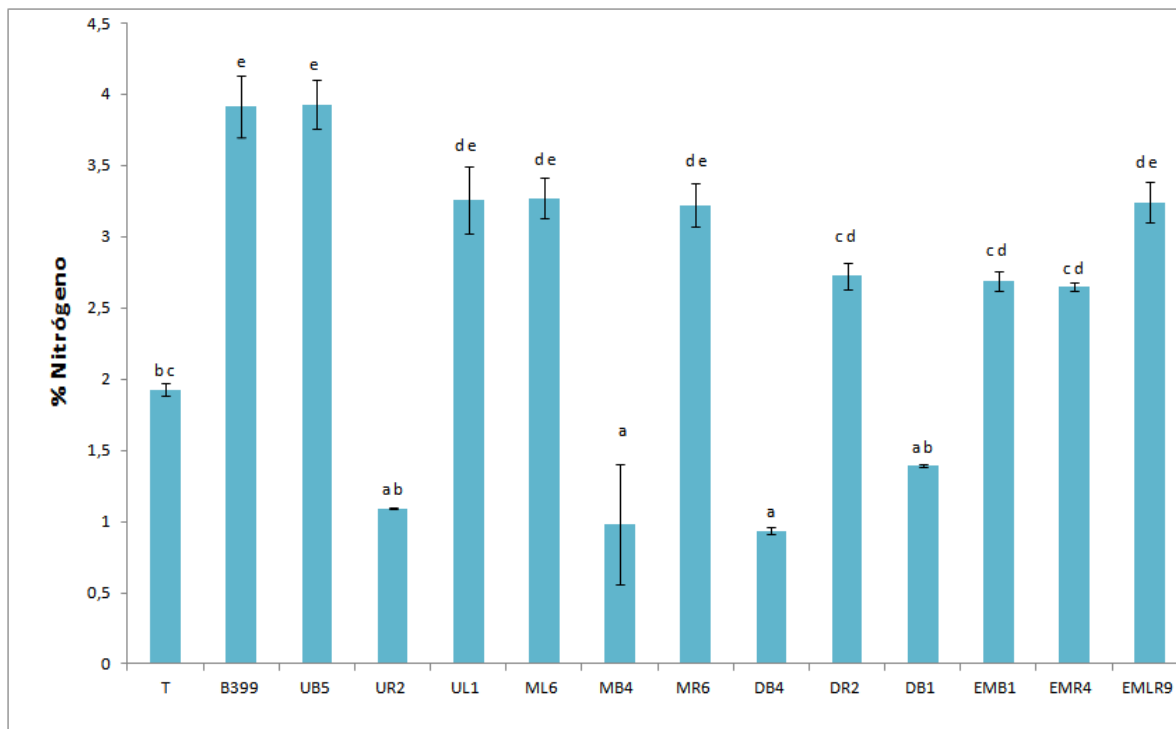


Figura 17. Contenido de nitrógeno de los tratamientos del ensayo en cámara climatizada.

(\* Expresado como gramos de nitrógeno por 100g de muestra)

*\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ).*

Se observa que existen diferencias significativas en el contenido de nitrógeno de los tratamientos UB5, UL1, ML6, MR6 y EMLR9 con el tratamiento Testigo y no se observan diferencias significativas entre los mismos tratamientos con la cepa B399.

Estos aislamientos mostraron muy buena nodulación por lo que se podría continuar evaluando sus propiedades PGPR, tanto en invernadero como posteriormente en ensayos de efectividad e infectividad realizados a campo.

#### 4.3.3.3. Contenido de Proteína

En la Figura 18 se observa el contenido de proteína, de los distintos tratamientos.

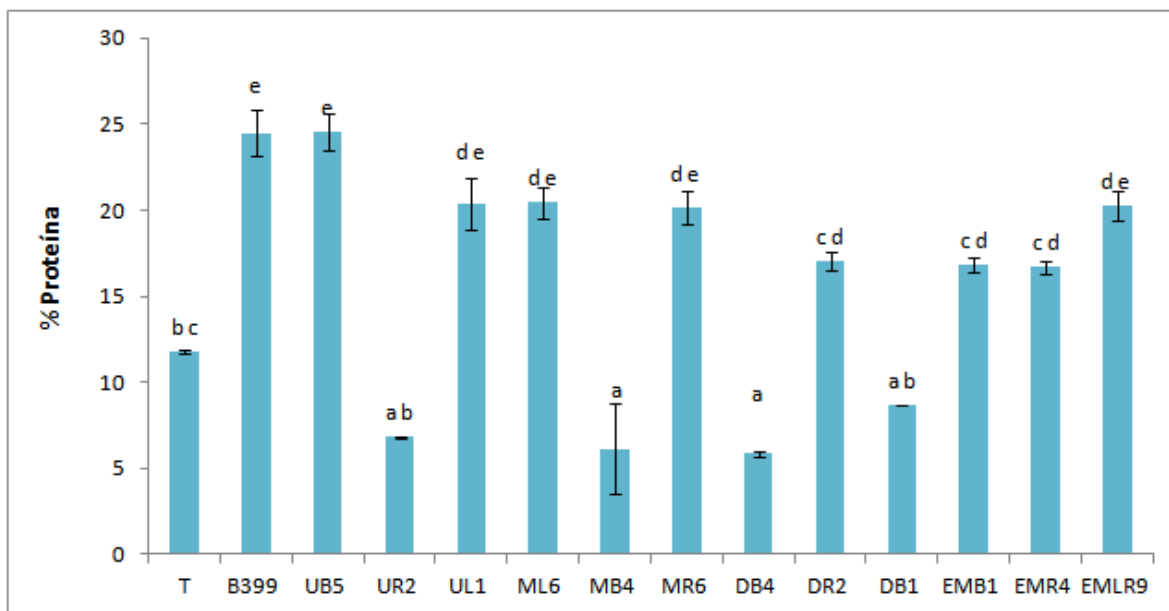


Figura 18. Contenido de Proteína de los aislamientos nativos obtenidos del ensayo en cámara climatizada.

(\* Expresado como gramos de Proteína por 100g de muestra)

*\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )*

Se observa que existen diferencias significativas entre los tratamientos UB5, UL1, ML6, MR6 y EMLR9 con el tratamiento Testigo y no se observan diferencias significativas entre los mismos tratamientos con la cepa B399. Este aumento del contenido de proteínas, en relación al Testigo sin inocular, evidencia una mejora en el cultivo, ya que este parámetro es utilizado para indicar la calidad de los mismos (Basigalup and Ustarroz, 2007).

#### 4.3.3.4. Índice de Eficiencia Relativo (IER)

Según el inciso 3.4 de Materiales y Métodos el cálculo de IER se debe realizar teniendo en cuenta el valor del tratamiento del testigo nitrogenado. Como se descartó dicho valor, se decidió determinar el IER con respecto a la cepa de referencia B399, la cual es recomendada para la inoculación de alfalfa por IMYZA-INTA, Castelar (Peticari, 2006).



Para la realización de este cálculo se reemplazó el peso seco del testigo nitrogenado por el peso seco de la cepa B399.

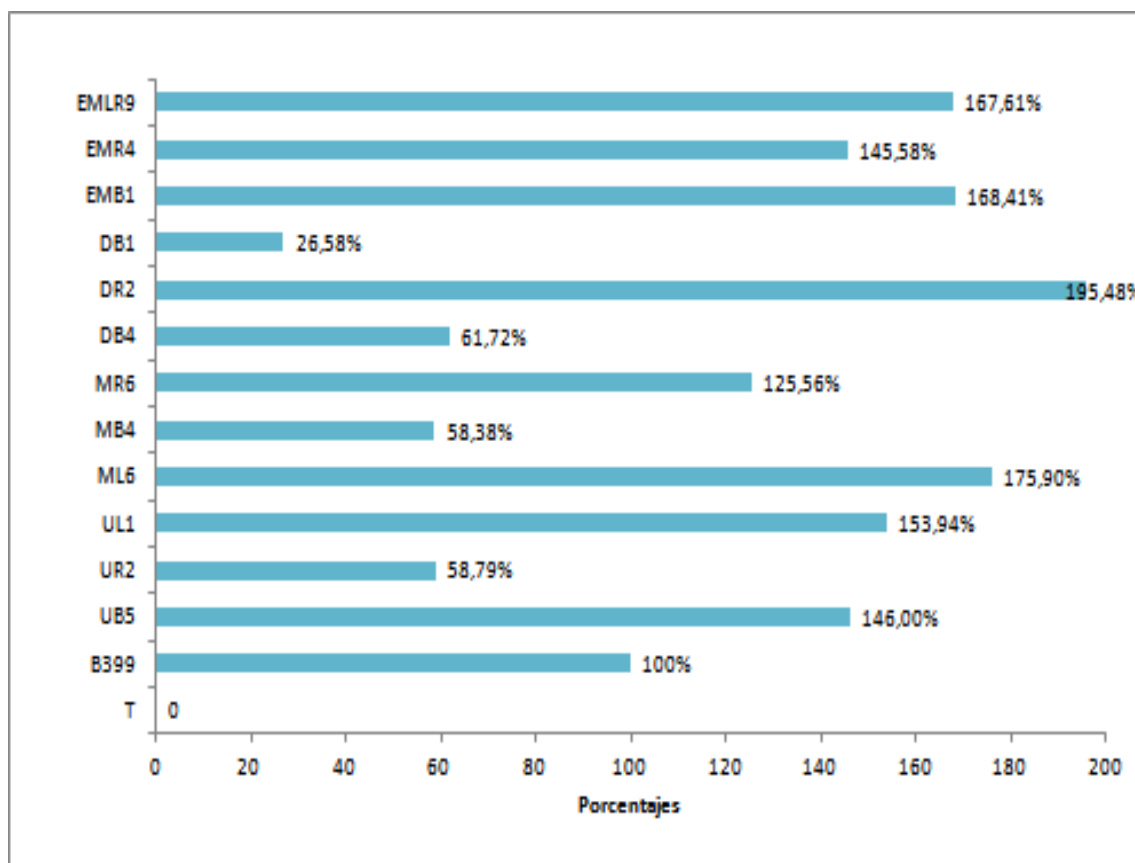


Figura 19. IER de los aislamientos nativos utilizados en el ensayo en cámara.

Como se puede observar en la Figura 19, de los 12 aislamientos nativos, solamente 4 de ellos (UR2; MB4; DB4; DB1) presentaron un IER menor al 70%; es de destacar que 3 de estos aislamientos pertenecen a muestras de suelo tomadas del Bajo, en las cuales el proceso de salinización pudo haber afectado en mayor medida sus propiedades fisiológicas, como ser: la actividad nitrogenasa o la capacidad para realizar la simbiosis (Singlenton and Bohool 1984; Soussi et. al. 1999; Tejera et. al. 2006).

El resto de los aislamientos presentaron valores superiores al 100%, por lo que podrían ser considerados promisorios para análisis posteriores.

#### 4.3.3.5. Correlación entre los valores de peso seco y porcentaje de nitrógeno

En la Figura 20 se observa la correlación entre peso seco y porcentaje de nitrógeno del ensayo en cámara.

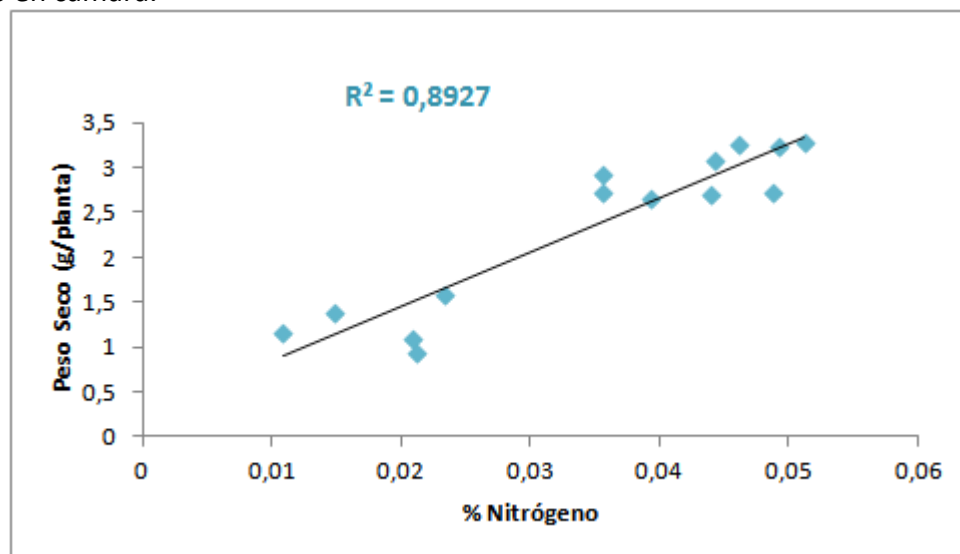


Figura 20. Correlación entre los valores de peso seco y % Nitrógeno

Como se observa en la Figura 20, existe una correlación significativa entre el contenido de nitrógeno (% N) y los valores de peso seco, lo que indica que a mayores valores de materia seca, mayor es el porcentaje de nitrógeno fijado y esto se traduce en un mayor desarrollo de las plantas, con un consecuente aumento en el contenido de proteínas y calidad del cultivo.

#### 4.4. Caracterización de los aislamientos

Debido a la posibilidad de realizar un ensayo a campo en la zona de Metileo, se seleccionaron para su caracterización y evaluación los aislamientos: MR6 y ML6 que presentaban buen contenido de nitrógeno, peso seco e índice de eficiencia relativa y el aislamiento MB4, que si bien no tenía buenos parámetros de peso seco, nitrógeno e índice de eficiencia relativa, se seleccionó por ser el único aislamiento obtenido del bajo salino.

#### 4.4.1. Morfología de las colonias

Los aislamientos MR6, ML6 y MB4, se caracterizaron por presentar colonias grandes de 2-5 mm, circulares, convexas, rosadas y mucosas en medio YEM (CIAT, 1988) (Figura 21). Además presentaron un desarrollo abundante y un crecimiento rápido (entre 3 y 5 días), común en las especies de los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (CIAT, 1988; Pérez et al., 2008).



Figura 21. Aislamiento (ML6) en placa de Petri en medio YEM. (Crecimiento similar fue observado para los otros aislamientos).

#### 4.4.2. Observación microscópica y tinción de GRAM

La observación al microscopio mostró que las bacterias eran bacilos cortos, pequeños y finos, no formadores de esporas y móviles cuando el cultivo es joven, y con menor movilidad a medida que transcurre el tiempo (Vincet, 1970).

Luego de realizada la Tinción de GRAM y su posterior observación microscópica, se observó que todos los aislamientos eran GRAM negativos (-), dado que no absorben el colorante violeta cristal y si la safranina (colorante rosa), observándose dicha coloración en la Figura 22. Estas características aparecen en los diferentes géneros de rizobios (Garrity and Holt, 2001).

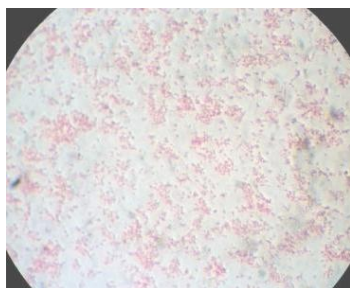


Figura 22. Fotografía del aislamiento MR6, luego de realizada la tinción de GRAM.

#### 4.4.3. Electroforesis de isoenzimas (M.L.E.E.)

Se caracterizó a los tres aislamientos (ML6; MR6; MB4) mediante la técnica de electroforesis de isoenzimas en geles de poliacrilamida (M.L.E.E) (Selander *et. al.* 1986), pudiendo distinguirse diferencias entre el perfil de isoenzimas para  $\alpha$  y  $\beta$  esterasas de los aislamientos nativos con las cepas de referencia (B399 y Lq51) (Figura 23).

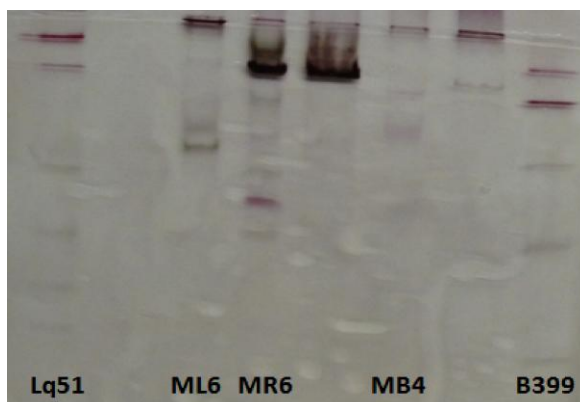


Figura 23. Zimograma revelado para  $\alpha$  y  $\beta$  esterasas

Se realizó el análisis de la electroforesis utilizando el software Ntsys v1.70 (Figura 24).

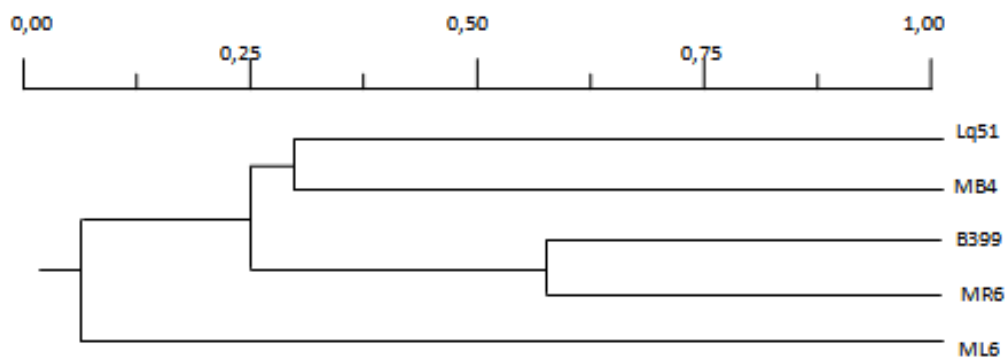


Figura 24. Dendrograma de los aislamientos en estudio en función de sus perfiles de  $\alpha$  y  $\beta$  esterasas.

Analizando el dendrograma se observa una similitud con respecto al perfil isoenzimático de  $\alpha$  y  $\beta$  esterasas del 28% entre los aislamientos MB4 y la cepa Lq51, 57% entre el aislamiento MR6 y la cepa B399, un 25% de similitud entre estos dos grupos y un 5% entre el aislamiento ML6 y los dos grupos anteriores.

Como se observó en el dendrograma, el aislamiento ML6 es el que menos porcentaje de similitud presenta tanto con la cepa Lq51, como con la cepa de referencia B399, a pesar de haber obtenido los tres aislamientos ensayados de la misma zona.

Estos datos nos permiten conocer una parte de la rica diversidad que presenta la comunidad de rizobios del sitio estudiado.

#### 4.4.4. Desarrollo en medio de cultivo líquido y determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento: velocidad de crecimiento y tiempo de generación

A los aislamientos seleccionados se les determinaron los parámetros cinéticos de crecimiento con el fin de saber si poseían las aptitudes biotecnológicas adecuadas, para una posterior transferencia a la industria de inoculantes.

Los microorganismos se desarrollaron en el medio proceso de la Tabla 4 y se obtuvieron las curvas de crecimiento que se muestra en la Figura 26. En todos los casos el pH se mantuvo cercano a la neutralidad lo cual permitió descartar posibles contaminaciones.

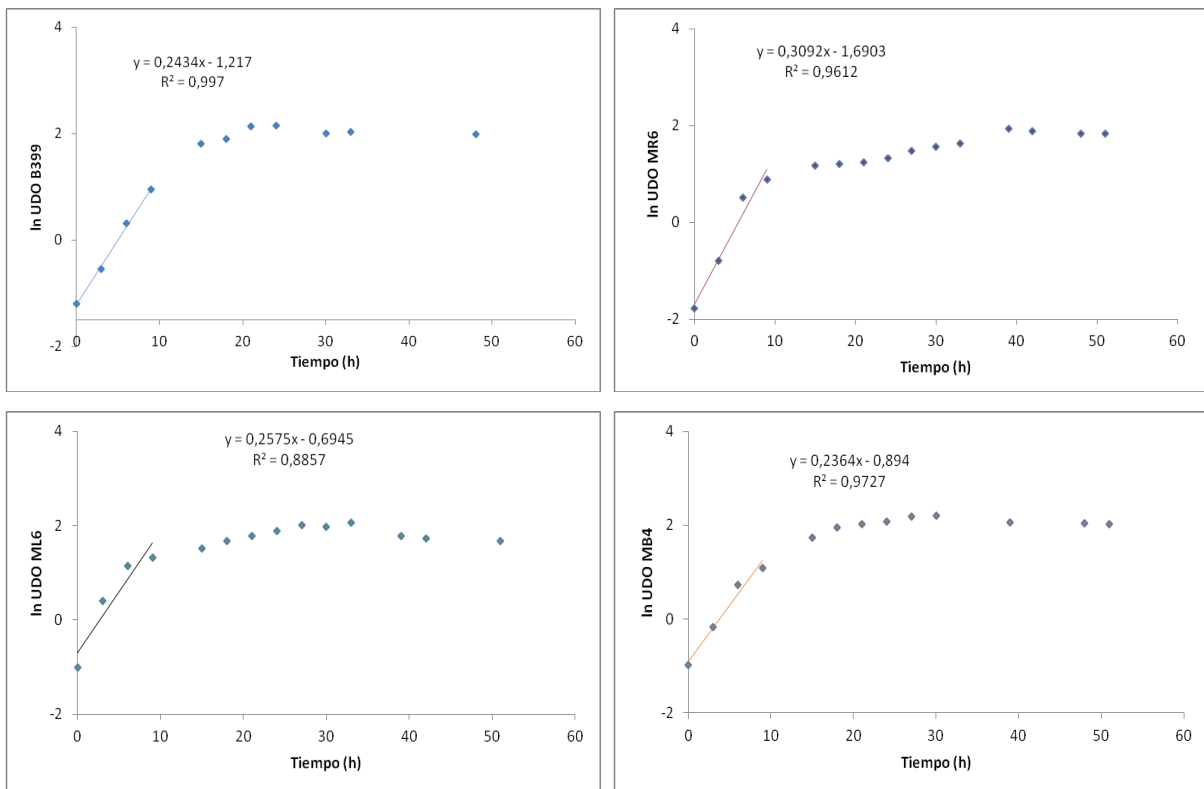


Figura 26. Curvas de crecimiento de los diferentes aislamientos y de la cepa B399.

A partir de la información que se obtiene de las curvas de la Figura 26, se calcularon los siguientes parámetros de crecimiento: velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) y tiempo de generación (tg). Dichos resultados se muestran en la Tabla 11.

Tabla N° 11. Parámetros de crecimiento de los aislamientos en estudio y de la cepa de referencia B399

Cepa/ aislamiento	$\mu_{\text{máx}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	tg (h)
B399	0,2434	2,84
MR6	0,3092	2,24
ML6	0,2575	2,69
MB4	0,2364	2,93

En función de la velocidad de crecimiento, los rizobios pueden dividirse en dos grupos: rizobios de crecimiento rápido, en el que se encuentra a los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium* y los de crecimiento lento representado por el género *Bradyrhizobium*.

Los mencionados parámetros cinéticos se encuentran en el rango de 2-4 horas, que concuerda con lo señalado por la bibliografía para rizobios de crecimiento rápido (Ballati and Jardim Freire, 1996).

#### 4.4.5. Crecimiento de los microorganismos a distintas concentraciones de NaCl

Los aislamientos en estudio se sembraron en el medio de la Tabla 3, con sus correspondientes modificaciones en la concentración de NaCl, como se indica en Materiales y Métodos, con el fin de evaluar la tolerancia de los aislamientos en su crecimiento en las diferentes concentraciones de sal.

Como se observa en la (Figura 27), el número de colonias no fue reducido en los tratamientos de 0 y 85,5 mM de NaCl (0 y 10,9 mS.cm<sup>-1</sup>), mientras que si se observó una disminución del crecimiento en el de 256 mM de NaCl (25,3 mS.cm<sup>-1</sup>). En esta concentración todos los aislamientos mostraron reducción de su crecimiento, incluida la cepa B399, la cual presentó una disminución menor. De los tres aislamientos en estudio,

ML6 fue el que manifestó una mayor reducción del crecimiento (65%), mientras que los aislamientos MB4 y MR6, si bien tuvieron una disminución de su crecimiento (42% y 36%), éste fue mucho menor. Ninguno de los aislamientos incluida la cepa B399 presentaron crecimiento en el tratamiento de 427 mM de NaCl ( $31,5 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Cabe destacar que esta concentración de 427 mM de NaCl, es muy superior a los valores encontrados en los suelos utilizados.

Si bien todos los aislamientos mostraron crecimiento a la concentración de 256 mM de NaCl, sería conveniente trabajar en suelos con un contenido menor a éste, para lograr un buen desarrollo y asegurar la supervivencia de los mismos, dado que ya en esta concentración de NaCl se comienza a evidenciar una disminución en el crecimiento de los microorganismos.

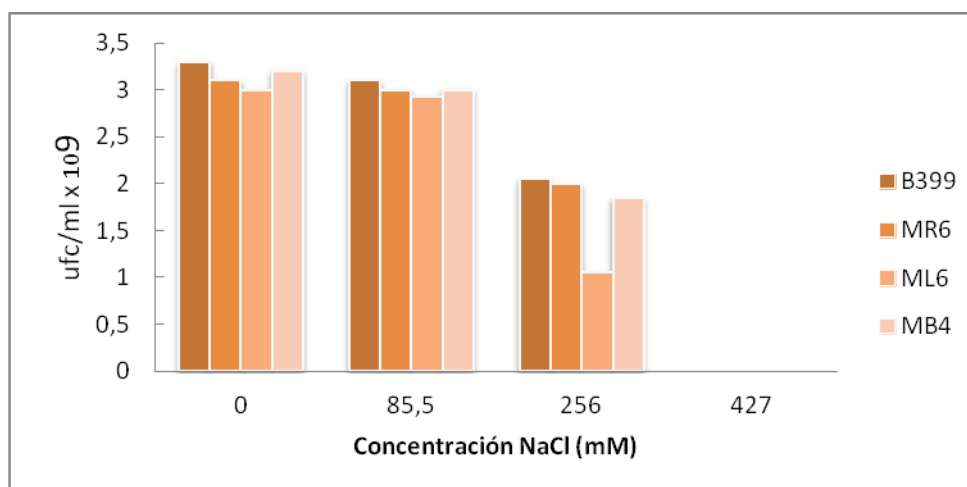


Figura 27. Efecto de diferentes concentraciones de NaCl sobre el crecimiento de *Sinorhizobium meliloti* B399 y *Rizobios nativos*.

#### 4.4.6. Determinaciones genéticas por las técnicas de PCR

Los tres aislamientos fueron caracterizados mediante la secuenciación del gen 16S, a través de la técnica de PCR. En la Figura 28 se muestra la electroforesis realizada en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos a partir de la extracción del DNA de cada uno de los aislamientos.

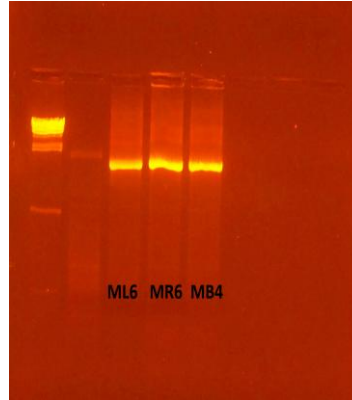


Figura 28. Fotografía de la corrida electroforética de los productos de PCR en gel de agarosa visto bajo luz UV.

La concentración e integridad del DNA extraído, así como el tamaño de los diferentes fragmentos de DNA pueden ser verificadas mediante electroforesis en geles de agarosa. Como se puede ver, en la Figura 28, solo se observa una banda intensa para cada uno de los aislamientos (un solo producto de PCR), condición necesaria para su posterior secuenciación.

#### 4.4.6.1. Identificación de los aislamientos por medio de la secuenciación del gen 16S

En las Figuras 29, 30 y 31 se muestran las secuencias obtenidas para los aislamientos analizados.

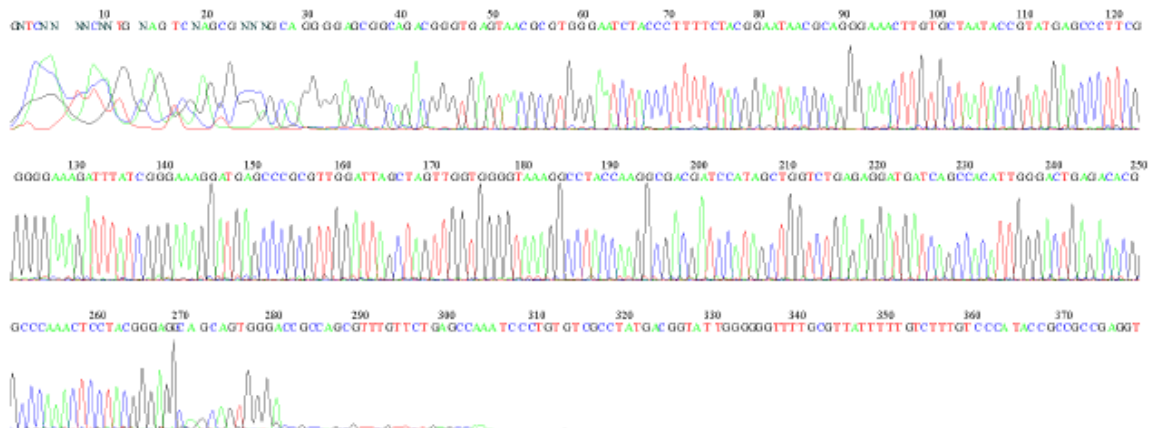


Figura 29. Secuencia de bases para el aislamiento ML6.



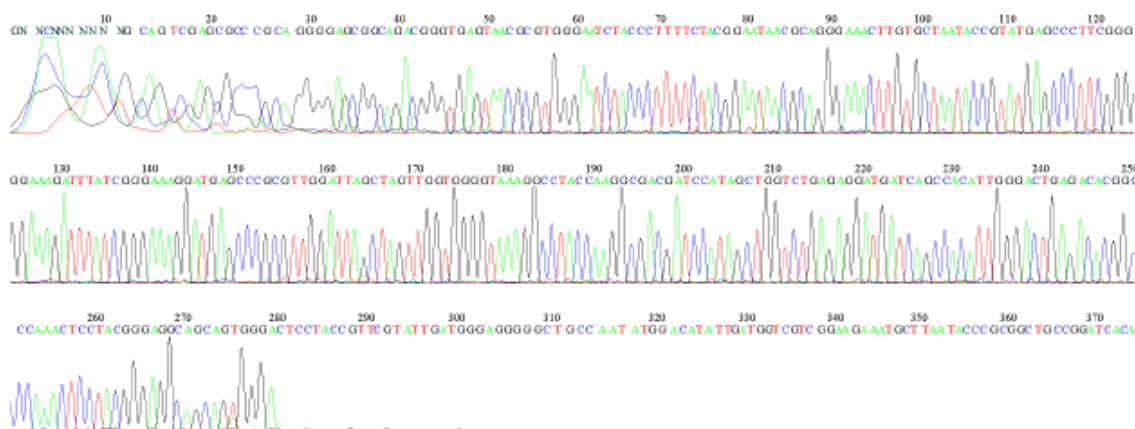


Figura 30. Secuencia de bases para el aislamiento MR6.

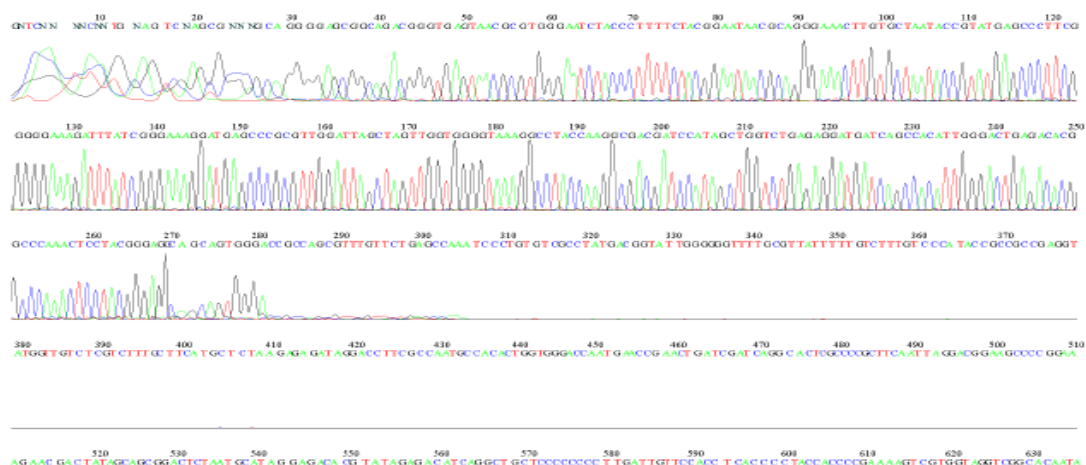


Figura 31. Secuencia de bases para el aislamiento MB4.

Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias almacenadas en el GenBank utilizando el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 12.

Tabla N° 12. Resultados obtenidos a partir de las secuencias de 16S

Aislamiento	Bp	Género	Especie	Homología
ML6	350	<i>Sinorhizobium</i>	<i>meliloti</i>	100%
MR6	310	<i>Sinorhizobium</i>	<i>meliloti, fredii</i>	100%
MB4	350	<i>Sinorhizobium</i>	<i>fredii, meliloti</i>	99%

Como se puede observar en la Tabla 11, los aislamientos ML6 y MR6 presentan una homología del 100% con el género *Sinorhizobium* y del 99% para el aislamiento MB4. Dicha identificación genética concuerda con las características morfológicas y bioquímicas que presentaron estos aislamientos.

#### 4.5. Ensayo en invernadero

##### 4.5.1 Análisis Cualitativo

Se realizaron observaciones durante el desarrollo del ensayo con el objetivo de monitorear el crecimiento de las plantas de cada uno de los tratamientos.



Figura 32. Disposición de las macetas al comienzo del ensayo.



Figura 33. Plantas de alfalfa a los 7 días posteriores a la siembra.



Figura 34. Plantas de alfalfa a los 30 días posteriores a la siembra.



Figura 35. Plantas de alfalfa a los dos meses de la siembra.

Figura 36. Plantas de alfalfa a los tres meses de su siembra.



Figura 37. Plantas de alfalfa a los cuatro meses de su siembra.

La secuencia de imágenes anteriores, permite evidenciar un desarrollo óptimo de las plantas durante el transcurso de todo el ensayo, dado que las mismas presentaron buena coloración sin ningún signo de marchitez ni senescencia.

### 4.5.2. Parámetros evaluados

(Nota: Durante el ensayo, el tratamiento Nitrogenado presentó bajo crecimiento, por lo que se decidió no tenerlo en cuenta para el posterior análisis de los resultados.)

#### 4.5.2.1. Peso seco

En la Figura 38 se representa el peso seco de los diferentes tratamientos.

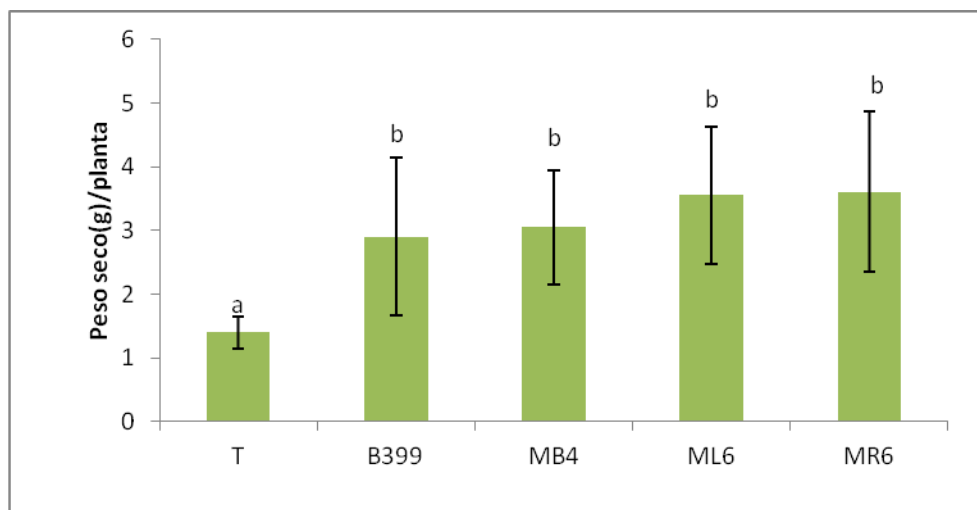


Figura 38. Peso seco de los tratamientos del ensayo en invernadero.

\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

Como se observa en la Figura 38, los aislamientos ML6, MR6 y MB4 presentan mayor desarrollo que el tratamiento testigo y se observa que existen diferencias significativas con éste. Si bien los valores de peso seco obtenidos de los tres tratamientos (MB4; ML6; MR6) son superiores al de la cepa B399, éstos no presentan diferencias significativas con dicha cepa.

Es importante destacar que el aislamiento ML6 en el ensayo en invernadero, no presenta diferencias significativas con la cepa B399, la que si se manifestó en el ensayo en cámara climatizada. Esto podría deberse, en parte, a la utilización de suelo como soporte para el ensayo, que asemeja más las condiciones reales del campo y no utilizar un sustrato artificial como en el ensayo en cámara.

#### 4.5.2.2. Contenido de Nitrógeno total

En la Figura 39 se muestra el contenido de nitrógeno de los diferentes tratamientos

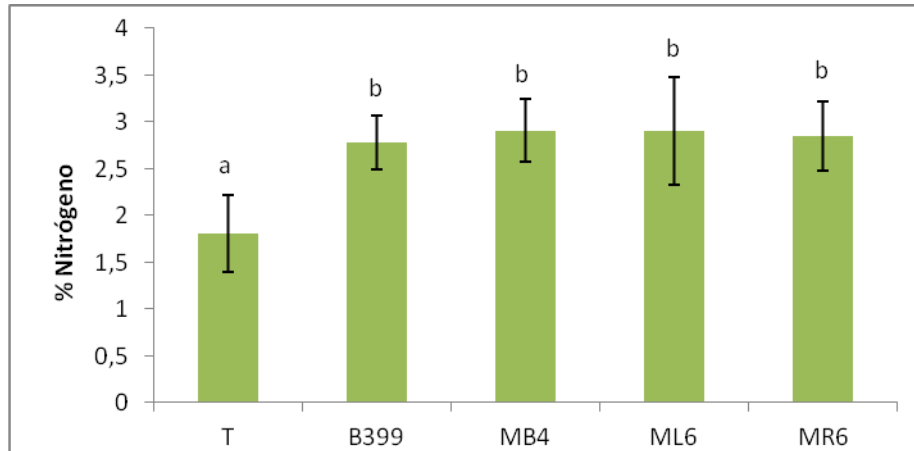


Figura 39. Contenido de Nitrógeno de los tratamientos del ensayo en invernadero.

*\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )*

(\* Expresado como gramos de Peso seco por 100g de muestra)

Analizando los valores de la Figura 39, se observan diferencias significativas entre el contenido de nitrógeno de los tres aislamientos ensayados y el tratamiento testigo; mientras que no existen diferencias significativas entre estos tres aislamientos y la cepa la cepa B399.

#### 4.5.2.3 Contenido de Proteína

En la Figura 40 se representa el contenido de proteína de los tratamientos ensayados en invernadero.

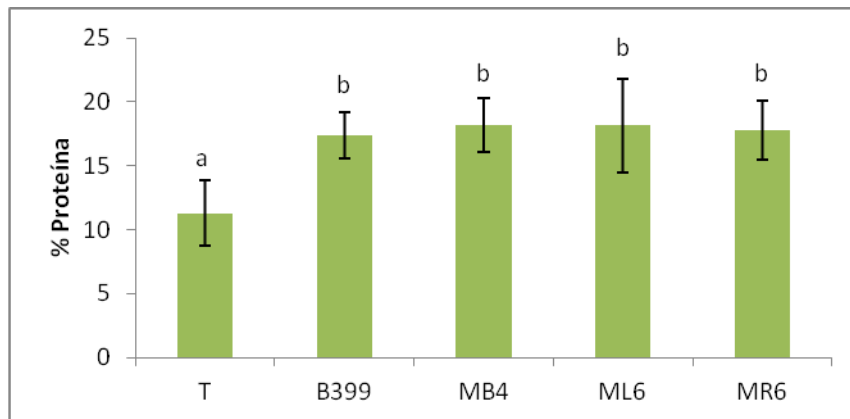


Figura 40. Contenido de Proteína de los tratamientos del ensayo en cámara climatizada.

(\* Expresado como gramos de Proteína por 100g de muestra)

*\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )*

Al igual que en el contenido de nitrógeno, todos los tratamientos muestran diferencias significativas en cuanto al contenido de proteína con el tratamiento Testigo, mientras que no se observan diferencias con la cepa B399.

#### 4.5.2.4. Correlación entre peso seco y porcentaje de nitrógeno

En la Figura 41 se observa la correlación entre peso seco y porcentaje de nitrógeno del ensayo en invernadero.

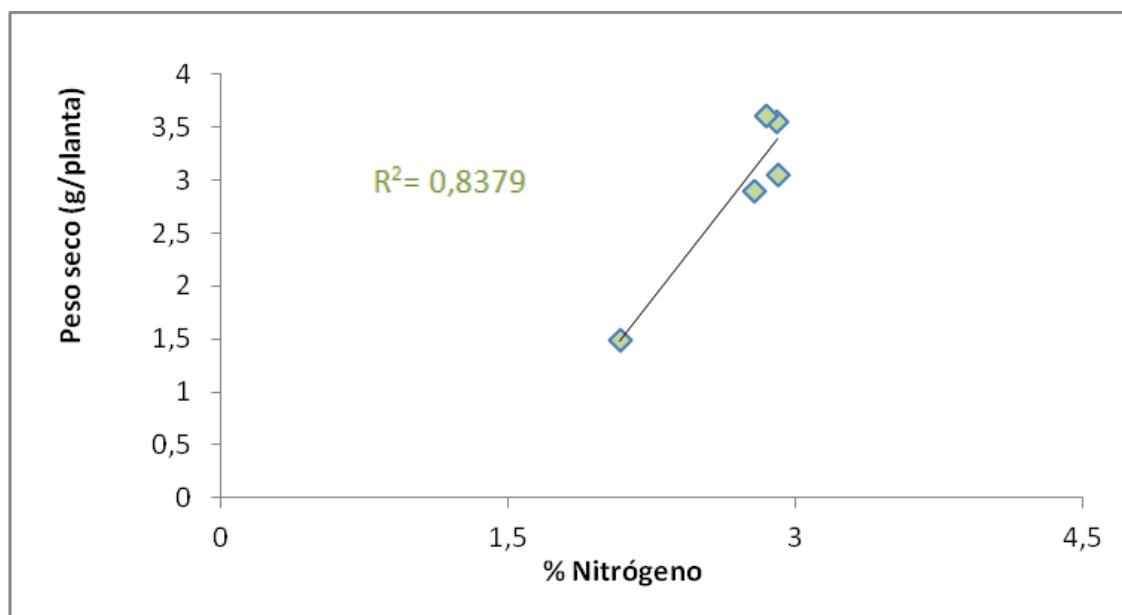


Figura 41. Correlación entre los valores de peso seco y % Nitrógeno.

Al igual que lo observado en el ensayo en cámara climatizada, existe una correlación significativa entre el contenido de nitrógeno (% N) y los valores de peso seco. Se evidencia que a mayor contenido de materia seca, mayor es el contenido de nitrógeno (% N), lo que es deseable para lograr una cultivo de buena calidad.

## 4.6. Ensayo a Campo

### 4.6.1 Análisis Cualitativo

En la Figura 42, se puede observar la disposición de las parcelas en el ensayo a campo realizado en la localidad de Metileo, La Pampa (S 35° 26,726 - W 64° 15,605).



Figura 42. Distribución de las parcelas en el campo.

**Consideraciones:** Cabe mencionar ciertas consideraciones:

-El ensayo estuvo influenciado por falta de precipitaciones durante la etapa de germinación, y las primeras etapas de crecimiento de las plantas, lo que condicionó no solo el desarrollo, sino también la menor cantidad de plantas por surco como se puede observar en la Figura 42.

-La Figura 43 muestra lugares con alta salinidad en los cuales se observa un escaso crecimiento de plantas. Esto se podría atribuir a la baja tolerancia de la alfalfa variedad Aurora a la salinidad, por lo que el experimento se podría repetir con otras variedades de mayor resistencia

Figura 43. Parcelas con escaso desarrollo de las plantas de alfalfa.



En razón de que no se observaron mejoras en el desarrollo del cultivo lo que puede atribuirse a la baja respuesta de la variedad de alfalfa utilizada y a que el régimen pluvial de la región no variaba, se dio por finalizado el ensayo en febrero de 2012; sin embargo se descalzaron de cada parcela entre 3 y 4 plantas y se comprobó presencia de nódulos.



#### 4. CONCLUSIONES

Los rizobios tienen la capacidad única de fijar nitrógeno en una compleja asociación simbiótica con las leguminosas y la misma tiene un enorme impacto sobre la agricultura sustentable como método de biofertilización. El aprovechamiento de este potencial requiere que la inoculación de las leguminosas con rizobios efectivos para la fijación de nitrógeno garantice el establecimiento de un sistema de nódulos activos capaz de asimilar y translocar la suficiente cantidad de nitrógeno a la planta.

Los rizobios efectivos naturalizados en los suelos compiten con los rizobios introducidos con los inoculantes en la ocupación de los nódulos. Superar el problema de la competición para la nodulación constituye hoy un gran desafío. Otra barrera que debemos superar la plantean los factores adversos tanto bióticos como abióticos.

En ambos casos, la selección de cepas adaptadas a ambientes locales son las herramientas más promisorias para superar tales obstáculos.

Teniendo en cuenta estos conceptos y los resultados de los ensayos generales realizados se puede establecer que:

- de acuerdo a las electroforesis isoenzimáticas, las poblaciones naturales son genéticamente diversas y disímiles de las cepas utilizadas en los inoculantes comerciales.

- de los aislamientos ensayados en cámara climatizada, ocho presentaron valores de IER superiores a los de la cepa de referencia B399, pudiendo considerarlos promisorios para otros estudios agronómicos y biotecnológicos.

En función de estos parámetros y teniendo en cuenta la posibilidad de llevar a cabo un ensayo a campo en la zona de Metileo, se acotaron los estudios a tres aislamientos MR6, ML6 y MB4 los que:

- se caracterizaron por ser Gram (-), de crecimiento rápido, tiempo de generación entre 2 y 4 horas y si bien el aislamiento MR6 presenta una similitud genética del 57% con la cepa B399 y menor al 50% los otros aislamientos, se pudo determinar mediante la

amplificación y secuenciación del gen 16S rDNA que los tres aislamientos corresponden al género *Sinorhizobium*.

-en el ensayo realizado en invernáculo presentaron buena nodulación y buen rendimiento de biomasa

-mostraron buen crecimiento en concentraciones de NaCl de hasta 256mM (1,5%NaCl) siendo dichos valores superiores a las concentraciones salinas encontradas en los suelos en estudio.

-en el ensayo a campo presentaron buena nodulación en las plantas que alcanzaron algún desarrollo, sin embargo en este ensayo no hubo un buen rendimiento del cultivo lo que podría deberse a la variedad de alfalfa utilizada.

#### **PERSPECTIVAS A FUTURO**

Si bien estos resultados son preliminares, es necesario repetir los estudios de efectividad e infectividad a campo, para lo cual se plantea, repetir el ensayo con una variedad de alfalfa resistente a la salinidad.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- AZCON-BIETO, F. AND TALÓN, M. (2000). Fundamentos de fisiología vegetal. McGraw-Hill. 16: 247-26
- BAIS, H. P.; WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILLORY, S and VIVANCO, J. M. (2006). The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms., *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:233–66
- BAKER, W.H.; THOMPSON, T. L. (1992). Determination of total nitrogen in plant samples by Kjeldhal In: CO Plank (ed) Plant analysis reference procedures for the Souther region of the United states. Souther Coop. series Bulletin 368:13-16.
- BALATTI, A. P. AND JARDIM FREIRE, J. R. (1996). Legume Inoculants. Selection and characterization of strains. Production, use and management. Departament of Chemistry, College of Exact and Natural Sciences. La Pampa University, Santa Rosa, La Pampa, Argentina; Departament of soil Science, College of Agriculture, Porto Alegre, RS, Brasil.
- BASHAN, Y. AND LEVANONY, H. (1991). Alterations in membrane potential and in proton efflux in plant roots induced by *Azospirillum brasilense*. *Plant Soil.* 137:99–103.
- BASIGALUP, D. H. AND ROSSANIGO, R. (2007). El cultivo de la alfalfa en la Argentina. Cap. 1:15-25. Ed: D.R. Basigalup. INTA.
- BASIGALUP, D. H. AND USTARROZ, E. (2007). Grazing alfalfa in the Argentinean Pampas. 37<sup>th</sup> California Alfalfa & Forage Symposium, Monterrey, CA.
- BERINGER, J.E.R. (1974). Factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 84:188-198.
- 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.
- BORISOV, A.Y.; MADSEN, L. H.; TSYGANOV, V. E.; UMEHARA, Y.; VOROSHILOVA, V. A.; BATAGOV, A. O.; SANDAL, N.; MORTENSEN, A.; SCHAUSER, L.; ELLIS, N.;

- TIKHONOVICH, I. A. AND STOUGAARD, J. (2003). The *sym 35* gene required for root nodule development in pea is an ortholog of *Nin* from *Lotus japonicas*. *Plant Physiology*, 131: 1009-1017.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 258-254.
  - 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.
  - CHRISTIANSEN-WENWEGER, C. (1992). N<sub>2</sub>-fixation by ammonium-excreting *Azospirillum brasilense* in auxin-induced tumours of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biol Fertil Soils*. 12:85–100.
  - CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) (1988). Simbiosis leguminosa-rizobium; Manual de Métodos de evaluación, selección y manejo agronómico. Ed. Rev. Proyecto CIAT-UNDP de evaluación selección y manejo de la simbiosis leguminosa rizobio para aumentar la fijación de nitrógeno. Sección de Microbiología de Suelos del Programa de Frijol (comp.). Cali, Colombia.
  - CORDOVILLA, M. D. P.; LIGERO, F. AND LLUCH, C. (1999). Effects of NaCl on growth and nitrogen fixation and assimilation of inoculated and KNO<sub>3</sub> fertilized *Vicia faba* and *Pisum sativum* L. plants. *Plant Science*. 140: 127-136.
  - CURTIS, H. AND SUE BARNES, N. (2000). *Biología*. Ed. Panamericana, 6° Edición, Buenos Aires, Argentina.
  - DEL POZO INAÑEZ, M. (1977). *La alfalfa, su cultivo y aprovechamiento* (2° ed.) Ediciones Mundi- Prensa Madrid, España, 379 p.
  - DI RIENZO, J.; GUZMAN, W. AND CASSANOVES, F. (2001). D.G.C. Test de Comparación de medias. InfoStat Version 1.1/Profesional. Grupo Infostat, facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba.

- FAO 2008. World Food Day stresses climate change and bioenergy effects on poor (disponible en <http://www.fao.org>)
- FOYER, C. H. AND NOCTOR, G. (2005). Oxidant and antioxidant signaling in plants: a reevaluation of the concept of oxidative stress in a physiological concept. *Plant cell and Environment*. 28: 1056-1071.
- FRIONI, L. (1999). Procesos microbianos. Colección manuales. Ed. De la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto, Argentina. Vol. I y II.
- GARCIA, O. F.; RUFO, M. L. and DAVEREDE, I. C. (1999). Fertilización de pasturas y verdes. IMPOFOS Informaciones Agronómicas de Cono Sur. 1: 2-1.
- GARRITY, G. M. and HOLT, J. G. (2001). The road map to the manual. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2<sup>nd</sup> 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.
- GEISSLER, N.; HUSSIN, S. AND KOYRO, H. W. (2008). Elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentration ameliorates effects of NaCl salinity on photosynthesis and leaf structure of *Aster tripolium* L. *Journal Experimental Botany*: doi: 10.1093/jxb/ern271.
- GERMIDA, J. J.; SICILIANO, S. D.; DE FREITAS, J. R. and SEIB, A. M. (1998). Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum*). *FEMS Microbiol. Ecol.* 26:43-50.
- GEPTS, P.; BEAVIS, W. D.; BRUMMER, E. C.; SHOEMAKER, R. C.; STALKER, H.T.; WEEDEN, N. F. AND YOUNG, N. D. (2005). Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the crops legume advances through genomics conference. *Plant Physiology*. 137: 1228-1235.
- GHITONI, N. E. AND BUENO, M. A. (1996). Changes in the cellular content of

- trehalose in four peanut rhizobia strains cultured under hypersalinity, *Symbiosis*, 20, 117.
- GLICK, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41:109-117.
  - GLICK, B. R.; PENROSE, D.M.; LI, J. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growthpromoting bacteria. *J Theor Biol.* 190:63–8.
  - HALBLEIB, C.M. AND LUDEN P.W. (2000). Regulation of biological nitrogen fixation. *J. Nutr.* 130: 1081-1084.
  - HERRIDGE, D. AND ROSE, I. (2000). Breeding for enhanced nitrogen fixation in crop legumes. *Field Crop Res.* 65: 229-248.
  - IGARASHI, R. Y. AND SEEFELDT, L. C. (2003). Nitrogen fization: the mechanism of the Mo dependent nitrogenise. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 38: 351-384.
  - IMPERIAL, J.; PALACIOS, J. M.; BRITO, B.; REY, L.; CABRERA, E.; URETA, A. C.; AND RUIZ-ARGUESO, T. (2006). El sistema hidrogenasa en las bacterias que nodulan leguminosas. En: *Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones*. Pp. 35-44. Sociedad de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). Granada. España.
  - Infoagro. (2005). <http://www.infoagro.com/herbaceos/forrajes/alfalfa.asp>
  - JACKSON, M. L. (1976). *Análisis Químico de Suelos*. Ed. Omega, 3º Edición, Barcelona, España.
  - KAHN, M. L.; McDERMOTT, T. M. AND UDVARDI, M. J. (1998). Carbon and nitrogen metabolism in rhizobia. En: *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated bacteria*. Spaink HP, Kondorosi A.; Hooykas, J.J. (eds),pp. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
  - KLOEPPER, J.W.; and SCHROTH, M. N. (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. Pages 879-882 in: *Proc. of the 4th Internat. Conf. on Plant Pathogenic Bacter.* Vol. 2, Station de Pathologie Vegetale et Phytobacteriologie, INRA, Angers, France.

- KLOEPPER, J.W. 1993. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. Pages 255-274 in: *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management*. F. B. Metting, Jr., ed. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- KLOEPPER, J.W. (1994). "Plant growth promoting rhizobacteria (other system)". En: *Azospirillum/Plant Association* (Y Okon, Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 135-166.
- KRASILNIKOV, M. (1961). On the role of soil bacteria in plant nutrition. *J Gen Appl Microbiol.* 7:128–44.
- KRUSELL, L.; MADSEN, L.H.; SATO, S.; AUBERT, G.; GENUA, A.; SZCZYGLOWSKI, K.; DUC, G.; KANEKO, T.; TABAT, S.; DE BRUJIN, F.; PAJUELO, E.; SANDAL, N. AND STOUGAARD, J. (2002). Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature.* 420: 422-426.
- LEMOS, E. G. (1994). Clasificación e identificación de Bradirizobios que nodulan soja por análisis de patrones isoenzimáticos, serología, morfología de colonias e actividades de hidrogenasa. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP. Tese de Livre-docência. 108 p.
- LEMOS, E. G. M.; CERON, C. R.; CAMPANHARO, J. C. AND LEMOS, M. V. F. (1994). Patrones isoenzimáticos em gel de poliacrilamida para diferenciación de Bradyrhizobium spp. *Anales XVI Reunión Latinoamericana de Rhizobiología*. Montevideo, Uruguay. Pp.:234.
- LEONG, J. (1986). Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* 24:187–208.
- LODEIRO, A.R.; LÓPEZ GARCÍA, S.L.; MONGIARDINI, E.; QUELAS, J.I. AND PERTICARI, A. (2003). Los rizobios y la inoculación de las leguminosas para la fijación simbiótica de Nitrógeno. *Microbiología Agrícola. Un aporte de la investigación Argentina*. Ed. Albanesi, A.; Anriquez, A.; Luna, S.; Kunst, C. y Ledesma, R. Universidad Nacional de Santiago del Estero. Capítulo 14, 275 p.

- LUGTENBERG, B. J. J.; DEKKERS, L.; and BLOEMBERG, G. V. (2001). Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 38:461-490.
- MANCHANDA, G, AND GARG, N. (2008). Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiologiae Plantarum.* 30: 595-618.
- MARSH, J. F.; RAKOCEVIC, A.; MILTRA, R. M.; BROCARD, L.; SUN, J.; ESCHSTRUTH, A.; LONG, S. R.; SCHULTZE, M.; RATET, P. AND OLDROYD G. E. D. (2007). *Medicago truncatula* NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin dependent kinase. *Plant Physiology.* 144: 324-335.
- MAUNOURY, N.; KONDOROSI, A.; KONDOROSI, E. AND MERGAERT, P. (2008). Cell biology of nodule infection and development. En: *Nitrogen-Fixing Leguminous Symbioses*. Dailworth M. J.; James E. K.; sprent J. I.; Newton W. E. (eds), pp. 153-189, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- NELSON, L. M. (2004). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants. Online. *Crop Management* doi:10.1094/CM-2004-0301-05-RV.
- ODEH, I.Q.A AND ONUS, A. (2008). "Spatiol analysis of soil salinity and soil structural stability in a semiarid región of New South Wales, Australia". *Environmental Management* 42: 265-278.
- OLIVARES PASCUAL, J. (2008). Fijación Biológica de Nitrógeno. Estación experimental Zaidin, CSIC, Granada, España.
- PEREZ, G.; GÓMEZ, G.; NÁPOLES, M.C. AND MORALES, B. (2008). Aislamiento y caracterización de cepas de rizobios aisladas de diferentes leguminosas en la región de Cascajal, Villa Clara. *Pastos y Forrajes* v.31 n.2, pp. 1-1.
- PERTICARI, A. (2006). Pasturas de alfalfa: importancia de una adecuada inoculación. Segundo Congreso Nacional de Conservación y Uso de Forrajes. IMYZA- CICVyA - INTA Castelar.
- PISTORIO, M. (2001). Identificación y caracterización molecular de plásmidos transmisibles por conjugación en aislamientos locales de *Sinorhizobium meliloti*.



Tesis doctoral. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. p.131.

- PORTA, J. AND HERRERO, J. (1996). Vulnerability of Soils under Irrigation. Kluwer Acad. Publ.: 85-96.
- PORTA CASANELLAS, J.; LÓPEZ-ACEVEDO REGUERÍN, M. AND ROQUERO DE LABURU, C. (2003). Edafología para la agricultura y el medio ambiente. Ed. Mundi-Prensa, 3ª Edición, Madrid, España.
- PROSPERI, J. M.; JENCZEWSKI, E.; ANGEVAIN, M. AND RONFORT, J. (2006). Morphologic and agronomic diversity of wild genetic resources of *Medicago sativa* L. collected in Spain. Genetic Resources and Crop Evaluation. 53: 843-856.
- RAMOS, J. AND BISSELING, T. (2003). A method for the isolation of root hairs from the model legume *Medicago truncatula*. Journal of Experimental Botany 54: 2245-2250.
- RUBIO, L. M. AND LUDDEN, P.W. (2008). Biosynthesis of the iron molybdenum cofactor of nitrogenase. Annual Review of Microbiology 62: 93-111.
- RONDON, M. R.; GOODMAN, R. M. and HANDELSMAN, J. (1999). The earth's bounty: Assessing and accessing soil microbial diversity. Trends Biotechnol. 17:403-409.
- RUSSELLE, M. P. AND BIRR, A. S. (2004). Biological nitrogen fixation. Large-scale assessment of symbiotic dinitrogen fixation by crops: Soybean and alfalfa in the Mississippi river basin, *J. Agron.*, 96, 1754.
- SAHLMAN, K. AND FAHRAEUS, G. (1963). An electron microscope study of root-hair infection by *rhizobium*. J. Gen. Microbiol. 33: 425-427.
- SAMAC, D.A. AND GRAHAM, M.A. (2007). Recent advances in legume microbe interactions: recognition, defense response, and symbiosis from a genomic perspective. Plant Physiology. 144: 582-587.
- SELANDER, R. K.; CAUGANT, D. A.; OCHMAN, H.; MUSSER, J. M.; GILMOUR, M. N. AND WHITTAN, T. S. (1986). Methods of multilocus enzyme electrophoresis for

- bacterial population genetics and systematics. Applied and Environmental Microbiology. 51:873-884.
- SHANNON, M.C. 1997. Adaptation of plants to salinity. Advances in Agronomy, 60: 75-120.
  - SINGLETON, P.W. AND BOHLOOL, B. B. (1984). Effect of salinity on the Nodule formation by soybean. Plant Physiol. 74: 72-76.
  - SIVAN A, Chet I. (1992). Microbial control of plant diseases. In: Mitchell R, editor. Environmental Microbiology. New York: Wiley-Liss,. pp. 335–54.
  - SMITH, B. E. (2002). Nitrogenase reveals its inner secrets. Science 297: 1654-1655
  - SHRESTHA, R.K.; LADHA, J.K.; (1996). Genotypic variation in promotion of rice nitrogen fixation as determined by nitrogen <sup>15</sup>N dilution. Soil Sci. Soc. Am. J. 60, 1815-1821.
  - SOUSSI, M.; LLUCH, C. AND OCAÑA, A. (1999). Comparative study of nitrogen fixation and carbon metabolism in two chickpea (*Cicer arietinum L.*) cultivars under salt stress. Journal of experimental Botany. 50: 1701-1708.
  - STUURMAN, N., BRAS, C.P.; SCHALAMAN, H.R.M.; WIJFJES, A.H.M.; BLOEMBERG, G. AND SPANIK, H.P. (2000). Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants. Mol. Plant-Microbe Interact. 13: 1163-1169.
  - SUPANJANI, S.; HABIB, A.; MABOOD, F.; LEE, K. D.; DONNELLY, D. AND SMITH, D. L. (2006). Nod factors enhances calcium uptake by soybean. Plant Physiology and Biochemistry. 44: 866-872.
  - SWANSON, J. A.; MULLIGAN, J. T. AND LONG, S. R. (1993). Regulation of *syrM* and *nodD3* in *Rhizobium meliloti*. Genetics, 134: 435-444.
  - TEJERA, N. A.; SOUSSI, M. AND LLUCH, C. (2006). Physiological and nutritional indicators of tolerance to salinity in chickpea plants growing under symbiotic conditions. Environmental and Experimental Botany. 58: 17-24.

- THIES, J. E.; SINGLETON, P. W and BOHLOOL, B. B. (1991). Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 19
- TUEBER, L. R. AND BRICK, M. A. (1988). Morphology and Anatomy. In A. A. Handsn, D. K. Barnes and R. R. Hill. Jr. (ed) Alfalfa and Alfalfa Improvement, Capítulo 4. Agronomía series 29, ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, USA, pp. 125-162.
- URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S.; BODDEY, R.M. (1992). Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56, 105-114.
- URZÚA, H. (2000). Fijación Simbiótica de Nitrógeno en Chile: Importante herramienta para una agricultura sustentable. Publ. XX Reunión Latinoamericana de Rizobiología (IDEMA/U.S. Agustín). Arequipa, Perú. 221-228.
- VANCE, C. P. (1998). Legume symbiotic nitrogen fixation: agronomic aspects. En: *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of model Plant-Associated Bacteria*. Spaink HP, Kondorosi A.; Hooykas J. J.; (eds), pp. 509-530, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- VANCE, C. P. (2008). Carbon and Nitrogen metabolism in legume nodules. En: *Nitrogen-Fixating Leguminous Symbioses*. Springer. Dordrecht, The Netherlands. pp. 293-320.
- VINCENT, J. M. (1970). *A manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- WILD, A. (2003). *Soil, land and food: managing the land during the twenty-first century*. Cambridge University. Press pp 245, Cambridge, UK.
- XIE, H.; PASTERNAK, J.J.; GLICK, B.R. (1996). Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indoleacetic acid. *Curr Microbiol.* 32:67–71.

- ZHRAN, H. H. (1999). Rhizobium legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in a arid climate. Microbiology and molecular Biology. 63: 968-989.
- ZHU, J. K. (2001). Plant salt tolerance. Trends in Plant Science 6: 66-71.