



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Tesina presentada para obtener el grado académico de  
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

“UTILIZACIÓN DE MICROORGANISMOS NATIVOS SIMBIONTES DE *Vicia spp.*  
PARA MEJORAR LA EFICIENCIA DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO  
EN LA REGIÓN SEMIÁRIDA PAMPEANA, ARGENTINA.”

DALMASO, ROMINA YANET

SANTA ROSA (LA PAMPA)

ARGENTINA

2017

## **PREFACIO**

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Ciencias Biológicas 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 Laboratorio de Microbiología, dependiente del Departamento de Química, durante el período comprendido entre el 22 de abril de 2016, Res. N° 136/16 y el 13 de noviembre de 2017, bajo la dirección de la Dra. GARCÍA, Patricia; y bajo la codirección de la Dra. LORDA, Graciela.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi directora Patricia, a mi co-directora Graciela y a todo el grupo de investigación por brindarme sus conocimientos, tiempo, dedicación, apoyo y afecto en todo momento y por despertar mi pasión por la microbiología. Gracias por compartir conmigo estos años, me llevo una gran amistad.

A mi familia por aguantarme y brindarme todo su apoyo incondicional desde el inicio, en los buenos y malos momentos.

A mis amigos, con los que compartimos ese amor por la biología y me soportaron desde el primer día, formando miles de anécdotas y recuerdos. Gracias por estar siempre.

A todos ¡Muchas gracias de corazón! Sin ustedes no habría llegado a donde estoy hoy.

Esta tesis va dedicada a vos... MAMÁ!!

DALMASSO, Romina Yanet

14/12/2017

Departamento de Química

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

## **RESUMEN**

Los suelos de la Región Semiárida Pampeana, presentan ciertas limitantes a la producción agropecuaria, siendo las más importantes nitrógeno y agua. Los altos contenidos de arena de los suelos producen baja eficiencia en la fertilización química y riesgos de lixiviación, además de la contaminación generada. La fijación biológica de N<sub>2</sub> mediante la simbiosis rizobio-leguminosa produce un importante aporte de N al ecosistema terrestre de gran importancia agrícola y ecológica. En este trabajo se exploraron alternativas al par simbiótico *Rhizobium leguminosarum-Vicia spp.* a través de la búsqueda de cepas bacterianas nativas de la región semiárida pampeana, capaces de nodular y fijar nitrógeno eficientemente, con el fin de utilizarlas para formular inoculantes regionales. Se desarrollaron plantas de vicia a escala invernadero, para evaluar performance simbiótica. Todos los aislamientos fueron capaces de nodular. Alrededor del 50% de los aislamientos nativos de General Acha mostraron diferencias significativas respecto de la cepa comercial utilizada en inoculantes para vicia, *R. leguminosarum* D70, respecto de su performance simbiótica. Se evaluó la diversidad genotípica por BOX-PCR. El análisis del dendrograma reveló 4 grupos entre aislamientos con una homología del 70% relacionados con su origen geográfico, mostrando dentro de cada grupo, fingerprints muy similares. En condiciones de campo, las cepas aisladas poseen ventajas adaptativas a las condiciones físico químicas de la región respecto de la cepa de referencia. El uso de cepas nativas de Gral. Acha como inoculante maximizará los beneficios de la fijación simbiótica de N<sub>2</sub> y contribuirá al éxito de inoculantes para *Vicia spp.* para esta región.

## **ABSTRACT**

The soils of the Pampean Semiarid Region, have certain limitations to the agricultural production, being the most important nitrogen and water. The high content of sand soils produce low efficiency in chemical fertilization and risks of leaching, in addition to the pollution generated. Biological N<sub>2</sub> fixation by the legume-rhizobia symbiosis produces an important input of N to the terrestrial ecosystem of great agricultural and ecological importance. In this work were explored alternatives to the symbiotic pair *Rhizobium leguminosarum-Vicia spp.* through the pursuit of native bacterial strains of the pampean semiarid region, capable of nodular and fix nitrogen efficiently, in order to use them to formulate regional inoculants. Plants of vicia scale greenhouse, were developed to evaluate symbiotic performance. All isolates were capable of nodular. Around 50% of of General Acha native isolates showed significant differences from the commercial strain used for inoculants for vicia, *R. leguminosarum* D70, with regard to their symbiotic performance. We evaluated the genotypic diversity by BOX-PCR. Analysis the dendrogram revealed 4 groups among isolates with a homology of 70% related to its geographical, within each group, showing very similar fingerprints. Under field conditions, the isolated strains possess chemical adaptive advantages to the physical conditions of the region with respect to the reference strain. The use of native strains of Gral. Acha as inoculant will maximize the benefits of symbiotic N<sub>2</sub> fixation and will contribute to the success of inoculants for *Vicia spp.* for this region.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Suelos, producción de alimentos y uso de fertilizantes nitrogenados .....	1
1.2. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y su uso como biofertilizantes ....	3
1.3. Los suelos de la región semiárida y los cultivos de cobertura .....	5
1.4. Formulación de biofertilizantes y utilización de cepas nativas.....	7
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>8</b>
2.1. Hipótesis.....	8
2.2. Objetivo General .....	8
2.3. Objetivos Específicos.....	8
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>9</b>
3.1. Aislamiento de microorganismos simbioses de <i>Vicia</i> spp. ....	9
3.2. Conservación de los microorganismos.....	10
3.3. Evaluación de infectividad y efectividad de cepas nativas sobre plantas de vicia en escala invernadero .....	10
3.3.1. Ensayos en plantas a escala invernadero .....	11
3.3.2. Parámetros de crecimiento de plantas .....	12
3.4. Caracterización genotípica de los aislamientos.....	12
3.4.1. Acondicionamiento de los aislamientos para caracterización por BOX-PCR ...	13
3.4.2. Obtención de los perfiles BOX-PCR de las cepas nativas incluyendo la cepa de referencia .....	13
3.5. Caracterización fenotípica de los aislamientos .....	13
3.3.1. Medio de cultivo.....	14
3.3.2. Parámetros fisiológicos de crecimiento.....	15
3.6. Análisis estadísticos .....	15
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>17</b>
4.1. Evaluación de infectividad y efectividad de cepas nativas sobre plantas de vicia en escala invernadero .....	17
4.1.1. Determinación de número de nódulos totales por planta .....	17
4.1.2. Determinación de peso fresco de la parte aérea .....	19
4.1.3. Determinación de peso seco de parte aérea .....	20
4.1.4. Determinación de contenido de nitrógeno de parte aérea .....	22
4.2. Caracterización taxonómica de los aislamientos obtenidos mediante determinaciones genotípicas y fenotípicas .....	24

4.2.1 Caracterización genotípica de los aislamientos por BOX-PCR para determinar el número de cepas diferentes obtenidas .....	24
4.2.2. Caracterización fenotípica de las cepas mediante determinaciones fisiológicas y morfológicas .....	26
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>31</b>
<b>6. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>34</b>
<b>7. PERSPECTIVAS A FUTURO .....</b>	<b>35</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>36</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>40</b>

## **1. INTRODUCCIÓN**

### ***1.1. Suelos, producción de alimentos y uso de fertilizantes nitrogenados***

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) estima que la demanda total de productos agrícolas en 2030 será un 60% mayor que en el presente y más del 85% de esta demanda adicional provendrá de los países en desarrollo. Durante más de medio siglo, el mundo se ha centrado en aumentar el rendimiento de los cultivos para lograr abastecer una demanda cada vez mayor de alimentos. Los suelos juegan un papel importante en la determinación de la productividad sostenible de un agroecosistema, la cual depende principalmente de su capacidad para suministrar los nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas (Abd-Alla, et al., 2014).

En este contexto surge la necesidad de implementar sistemas de manejo sustentables, los cuales deben satisfacer los requerimientos actuales de la población humana sin comprometer el futuro, haciendo un uso eficiente de los recursos y, a su vez, mantener un equilibrio con el medio ambiente que sea favorable tanto para los seres humanos como para el resto de los seres vivos (Ferrerias, et al., 2007).

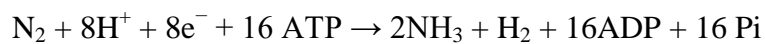
La deficiencia de nutrientes se ha convertido en un obstáculo importante para la productividad, estabilidad y sostenibilidad de los suelos, siendo uno de los factores más importantes para la generación de altos rendimientos en los cultivos el uso de fertilizantes nitrogenados. Es por ello que los agricultores están aplicando altas cantidades de fertilizantes, los cuales además de ser muy costosos, presentan baja eficiencia de fertilización y altos riesgos de lixiviación por los contenidos de arena de los suelos de nuestra región (Estavillo, et al., 1996). Se debe contabilizar además los efectos nocivos para la salud humana y el medio ambiente que se generan especialmente cuando se utilizan de forma discriminada, como contaminación de acuíferos por compuestos nitrogenados, eutrofización de ecosistemas acuáticos por el crecimiento excesivo de organismos fotosintéticos, destrucción de la capa de ozono y efecto invernadero por la liberación a la atmósfera de óxidos de nitrógeno (Guzman Arrausi, 2011).

El nitrógeno, uno de los constituyentes esenciales de las biomoléculas, si bien es un elemento abundante en el planeta ya que se encuentra formando rocas ígneas, rocas sedimentarias, como nitrógeno atmosférico y como componente de la biomasa oceánica y terrestre, presenta una biodisponibilidad muy baja. La causa es que la molécula de

nitrógeno (N<sub>2</sub>) es químicamente inaccesible para la mayor parte de los seres vivos por lo que no puede ser utilizada como fuente de nitrógeno para la formación de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y vitaminas, entre otros. (Gustchick, 1981; Risser y Parton, 1982; Vitousek y Howarth, 1991; Danso, 1995).

El ciclo del nitrógeno consiste en una serie de reacciones de óxido-reducción sucesivas, que conducen a la transformación de este elemento en formas accesibles para el metabolismo de animales, plantas y microorganismos, circulando de esta manera en forma cíclica a través del suelo y de la atmósfera (Bedmar et al., 2006).

La fijación o reducción del nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>) a distintas formas capaces de incorporarse a la composición del suelo o de los seres vivos, como amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), iones nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) o nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) puede ocurrir de forma abiótica o biológica. En el primer caso puede ocurrir por procesos químicos espontáneos, como la oxidación que se produce por la acción de los rayos, que forma óxidos de nitrógeno a partir del nitrógeno atmosférico, mientras que la fijación biológica depende de la habilidad metabólica de unos organismos llamados diazotrofos, los únicos seres vivos capaces de realizar esta reacción, portadores de la enzima nitrogenasa que les permite tomar N<sub>2</sub> y reducirlo a nitrógeno orgánico:



La fijación biológica de nitrógeno la realizan tres grupos de microorganismos diazotrofos:

\* Bacterias gran negativas de vida libre en el suelo, de géneros como *Azotobacter*, *Klebsiella* o *Rhodospirillum*.

\* Bacterias simbióticas de plantas, en las que viven de manera generalmente endosimbiótica en nódulos, principalmente localizados en las raíces, como por ejemplo la multitud de especies del género *Rhizobium*, que guardan una relación muy específica con el hospedador.

\* Cianobacterias, las de vida libre son muy abundantes en el plancton marino y los principales fijadores en el mar, y las simbióticas, como el caso de *Anabaena sp.* en cavidades subestomáticas de helechos acuáticos del género *Azolla*, o el de algunas especies de *Nostoc* que crecen dentro de *Antoceros* y otras plantas (Guzman Arrausi, 2011).

Si bien los recursos energéticos para la producción de fertilizantes nitrogenados a escala mundial no parecen limitantes en el corto plazo, la implementación de prácticas de



manejo que incrementen la eficiencia de utilización del N, será clave en el futuro cercano. La adopción de métodos que dependan primariamente de insumos renovables, y que mantengan o aumenten los niveles actuales de producción contribuirá a la sustentabilidad de los sistemas (Sainju y Singh, 1997).

### ***1.2. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y su uso como biofertilizantes***

Las rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas (PGPR) son bacterias de la rizósfera que mejoran el crecimiento vegetal mediante una amplia variedad de mecanismos como la solubilización de fosfatos, la producción de sideróforos, la fijación biológica de nitrógeno, la inhibición de la formación de biofilm, la producción de fitohormonas, la exposición de la actividad antifúngica, la producción de compuestos orgánicos volátiles, la interferencia con la producción de toxinas patógenas, entre otras. En la agricultura es cada vez mayor su utilización, ya que ofrece una manera atractiva para reemplazar el uso de fertilizantes químicos, pesticidas y otros suplementos (Bhattacharyya y Jha, 2012).

En la actualidad, existe una tendencia creciente a disminuir la dependencia de los fertilizantes químicos y aumentar la sostenibilidad de la agricultura mediante la exploración de fuentes alternativas, que poseen menor costo y son más amigables para el medio ambiente. Los biofertilizantes son una opción a los fertilizantes químicos, que mediante un proceso de fijación biológica, principalmente de nitrógeno, por medio de una simbiosis rizobio-leguminosa, devuelve este nutriente a los suelos de una manera sustentable, convirtiéndose en una tecnología promisoriosa (Bell, et al., 2010; Interrante, et al., 2011).

El ambiente rizosférico difiere del resto del suelo debido a la influencia ejercida por diversas actividades de las raíces, que puede extenderse a varios milímetros desde la superficie del vegetal. La influencia de las raíces es decisiva para la multiplicación y diversificación de los microorganismos que crecen asociados a este ambiente, debido a la secreción y exudación de diversos compuestos tales como azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, metabolitos secundarios, entre otros, que conducen a un enriquecimiento selectivo de nutrientes. Más aun, diversas especies de plantas suelen liberar diferentes perfiles de metabolitos en su rizosfera, e incluso una misma planta puede liberar diferentes compuestos a lo largo de su raíz, con lo cual la composición de las poblaciones

microbianas asociadas a la rizosfera suelen variar entre especies de plantas y entre distintas zonas de la raíz de una planta (Lucero, 2014).

En la rizosfera se encuentran presentes ciertas bacterias benéficas que mejoran el rendimiento de los cultivos en diferentes condiciones ambientales. Ellas juegan un papel clave en los ecosistemas naturales y tienen influencia en la productividad y nutrición de las plantas y en la inhibición de patógenos fúngicos. Los rizobios son las PGPR más estudiadas por su potencial para proporcionar a las leguminosas de un suministro constante de nitrógeno utilizable mediante la conversión de nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) en amonio ( $NH_4^+$ ), a cambio de un aporte de hidratos de carbono por parte de la planta huésped y un ambiente favorable para poder fijar dicho nutriente. Esta simbiosis contribuye con una parte considerable del nitrógeno combinado del planeta y permite a las plantas leguminosas crecer sin fertilizantes nitrogenados y sin empobrecer los suelos.

Los llamados colectivamente Rizobios son un grupo polifilético de bacterias cuya característica fenotípica que los distingue de otras bacterias es su habilidad de inducir el desarrollo de órganos fijadores de nitrógeno, llamados nódulos, en las raíces o tallos de plantas hospederas específicas que son leguminosas (Sadowsky y Graham, 1998).

Las bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* son células pequeñas (1,2-3,0  $\mu m$ ), Gram-negativas, con forma de bacilo corto, aerobias, que no forman esporas, móviles por flagelos peritricos o un solo flagelo lateral, que poseen la capacidad de producir nódulos en las raíces de las plantas leguminosas. Pertenecen a la familia Rhizobiaceae, que forma parte de las  $\alpha$ -proteobacterias. Son heterótrofas, comunes en el suelo, su temperatura óptima de crecimiento en condiciones artificiales es de 25-28°C y su tolerancia al pH es de 5 a 8.

Una simbiosis efectiva entre la bacteria y la planta, es el resultado de la acción de una cepa de rizobio con: a) capacidad para infectar y fijar el nitrógeno atmosférico, b) capacidad de colonización y supervivencia y c) competitividad en la rizósfera. La simbiosis es inhibida si existe un exceso de nitrato o amonio en el suelo.

La simbiosis entre una planta leguminosa y su microsimbionte se caracteriza por un proceso de intercambio de señales de múltiples etapas. Durante el crecimiento en la rizosfera de una planta hospedadora, los rizobios detectan compuestos como flavonoides y betaínas secretadas por la raíz y responden mediante la inducción de genes nod. Estos genes codifican para aproximadamente 25 proteínas, necesarias para la síntesis y exportación del factor Nod por parte de la bacteria. Los factores Nod son señales de lipo-

oligosacáridos que inician cambios tempranos en el desarrollo en la planta huésped durante el proceso de nodulación, incluyendo deformación de los pelos radiculares, despolarización de la membrana, oscilaciones de calcio intracelular, y el inicio de la división celular en la corteza de la raíz, que establece un meristema y nódulo primordial (Abd-Alla, et al., 2014).

Una vez que las bacterias entran en las raíces de las plantas, se transforman en bacteroides, los que llevan a cabo la fijación de nitrógeno en un proceso mediado por la enzima nitrogenasa. Ésta es producida por los bacteroides y es sensible al oxígeno, por lo que necesita un ambiente microaerofílico para ser activa. Esto es posible gracias a la leghemoglobina, una proteína producida por las leguminosas cuya función es eliminar el oxígeno de los simbiosomas (Peix, et al., 2015).

### ***1.3. Los suelos de la región semiárida y los cultivos de cobertura***

El uso de los suelos en la Región Semiárida Pampeana se ha intensificado en las últimas dos décadas, dejando de utilizar sistemas mixtos de producción con pasturas perennes seguido de cultivos anuales, para realizar secuencias continuas de cereales y oleaginosas anuales. Este hecho, junto con cambios tecnológicos que permitieron mayores índices de cosecha, han provocado una disminución en la reposición de carbono y nutrientes a los suelos de los sistemas agrícolas (Fernández, et al., 2012).

El uso de la rotación con cultivos de cobertura (CC), principalmente leguminosas, es una alternativa que mejora las condiciones físicas, químicas y biológicas del suelo. Consiste en sembrar un cultivo con el fin de generar cobertura entre dos cultivos de cosecha. Esta técnica permite atenuar la pérdida de carbono de los suelos, prevenir la erosión, aumentar la infiltración, capturar nutrientes, reducir sus pérdidas por lixiviación y contribuir al control de malezas y disminución de la presión de plagas y enfermedades. No requiere la aplicación de fertilizantes para lograr los potenciales rendimientos de los cultivos de la región semiárida pampeana. Es por ello que esta técnica de manejo se considera el sistema más ecológico y sostenible para los sistemas agrícolas bajo las escasas precipitaciones de esta región (Doran y Smith, 1991, Galantini, et al., 2000; Fernández, et al., 2012).

Otro aspecto potencialmente beneficioso de los CC es la absorción de nitratos con la consecuente retención del nitrógeno (N) en su biomasa, lo que disminuye las pérdidas por lixiviación que ocurrirían sin presencia del cultivo, principalmente durante barbechos largos. Esta inmovilización del N inorgánico podría condicionar la disponibilidad de este nutriente para el cultivo sucesor. Reicosky y Archer (2005) mencionan que el N

incorporado al suelo proveniente de biomasa es más eficientemente utilizado por las plantas que el N derivado de fertilizantes.

Las leguminosas son un gran grupo de plantas angiospermales que se encuentran en todos los continentes, capaces de crecer en ambientes acuáticos y terrestres muy diversos, bajo diferentes condiciones edáficas y climáticas. Forman una amplia familia llamada Fabaceae, la tercera familia más grande de angiospermas que comprende unas 20.000 especies y 750 géneros, que contiene tres subfamilias Papillioideae, Mimosoideae y Caesalpinioideae (Peix, et al., 2015).

La familia Fabaceae posee gran importancia económica, ya que incluye especies esenciales en la alimentación humana como el guisante (*Pisum sativum*), el garbanzo (*Cicer arietinum*) o la lenteja (*Lens culinaris*). A esta familia pertenecen también especies oleaginosas como la soja (*Glycine max*) y el maní (*Arachis hypogaea*); plantas forrajeras como la alfalfa (*Medicago sativa*) y el trébol (*Trifolium sp.*); colorantes como el índigo (*Indigofera tinctoria*); plantas ornamentales como la falsa acacia (*Robinia pseudoacacia*); y plantas medicinales como el sen (*Cassia acutifolia*), de hojas purgantes, tónicos cardíacos como la retama negra (*Cytisus scoparius*), antiespasmódicos y antiinflamatorios como el regaliz (*Glycyrrhiza glabra*) (Lucero, 2014).

En particular, el género *Vicia* L. pertenece a la familia Fabacea (magnoliopsidas del orden Fabales) y está representado por 180 a 210 especies, distribuidas en todas las regiones tropicales y templadas del mundo. En Argentina existen varias especies nativas, pero solo unas pocas especies introducidas han alcanzado difusión agrícola. Las vicias presentan varios usos agrícolas: hortícola, pastoreo directo, generalmente asociadas con cereales de invierno, abono verde o como cultivos de cobertura (Rebora, et al., 2013). La cepa recomendada por el INTA Castelar para el desarrollo de inoculantes para *Vicia spp.* es *Rhizobium leguminosarum* D 70.

Las vicias, como otras leguminosas, tienen la capacidad de fijar N<sub>2</sub> atmosférico mediante la simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*. Este proceso es muy eficiente en suelos con ciertas deficiencias del nutriente. Según Rochester y Peoples (2005), de la acumulación total de N en la biomasa de vicia, 75 al 90% deriva de la fijación biológica de N. Por ello, es importante asegurar la presencia de dichas bacterias en siembras de vicia mediante la inoculación de la semilla. Para una amplia diversidad de condiciones ambientales se halló que *V. villosa* acumula aproximadamente 36 kg N ha<sup>-1</sup> por tonelada de materia seca (Vanzolini y Galantini, 2013).

#### ***1.4. Formulación de biofertilizantes y utilización de cepas nativas***

La fijación biológica de nitrógeno llevada a cabo por la simbiosis *Rhizobium-leguminosa* tiene una gran importancia en agricultura, no solo por las cantidades de nitrógeno que incorpora al suelo, que puede alcanzar cifras superiores a los 200 kg N/ha año, sino que se trata de un sistema más eficiente, menos contaminante y más económico que la fertilización mineral (Guzman Arrausi, 2011).

La producción de inoculantes implica una primera fase de selección de estirpes que sean capaces de nodular y establecer simbiosis efectivas con las variedades de leguminosas cultivadas. Según las circunstancias, será necesario además que estas cepas compitan exitosamente con las nativas, para colonizar el suelo y nodular, así como que sean capaces de sobrevivir en la rizósfera. También interesa que las estirpes seleccionadas se adapten al proceso de producción de inoculantes, siendo capaces de alcanzar altas concentraciones en medios de cultivo estándar, en fermentadores industriales, tolerando los soportes y envases que se utilizan comercialmente, sobreviviendo bajo condiciones normales de almacenamiento y sobre las semillas inoculadas (Guzman Arrausi, 2011).

Poblaciones de leguminosas de diferentes regiones geográficas están asociadas con diferentes poblaciones de rizobios que difieren en la composición y diversidad de especies, además de diferencias genóticas intraespecíficas de los rizobios. Estas diferencias geográficas en la composición de especies de rizobios, tanto como la diversidad intraespecífica han demostrado estar relacionadas con las condiciones ambientales locales, siendo las principales el pH del suelo y la distancia geográfica (Van Cauwenberghe, et al., 2015). Además, la interacción entre los tipos de suelos y las temperaturas afectan la supervivencia de los rizobios y por lo tanto su disponibilidad para cultivos futuros (Evans, et al., 1993).

Así en los suelos existen poblaciones rizobianas nativas, adaptadas a las características edafoclimáticas de cada región, capaces de nodular y fijar nitrógeno de forma efectiva con una leguminosa específica, las cuales presentarían potencial para la formulación de biofertilizantes regionales (Sadowsky y Graham, 1998).

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### ***2.1. Hipótesis***

El hallazgo de cepas nativas simbiotes de *Vicia spp.* adaptadas a la región semiárida, es una alternativa para el mejoramiento del proceso de fijación de nitrógeno a partir de este par simbiote, como una contribución para el aumento y/o mantenimiento de la productividad de ese tipo de suelos.

### ***2.2. Objetivo General***

Explorar alternativas para el par simbiótico rizobio-*Vicia spp.* a través de la búsqueda de cepas bacterianas nativas de la Región Semiárida Pampeana que, por medio del proceso de fijación biológica de nitrógeno, mejoren la disponibilidad de este nutriente en suelos de esta región.

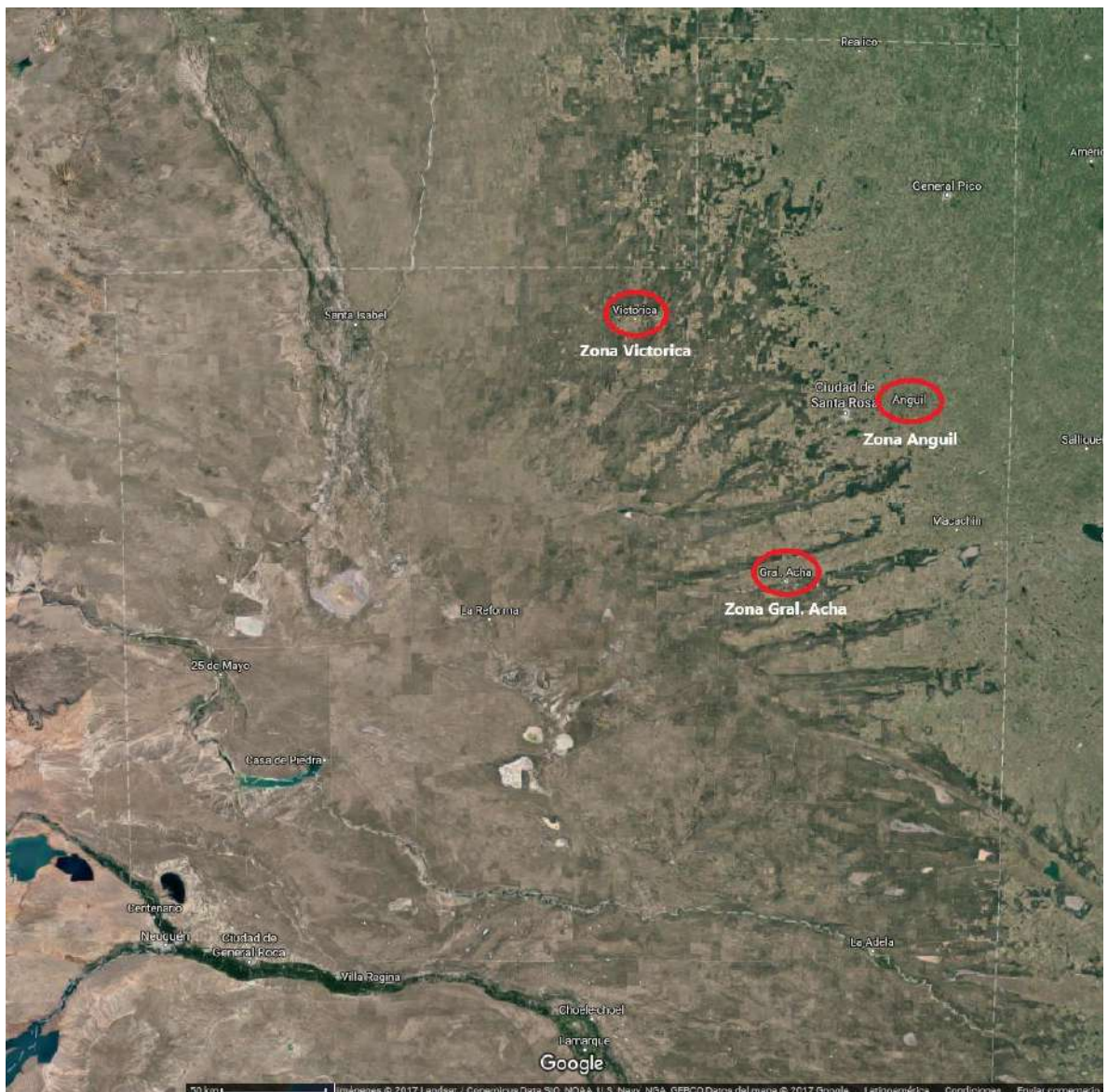
### ***2.3. Objetivos Específicos***

- ✓ Evaluar y seleccionar los aislamientos de bacterias fijadoras de nitrógeno en base a su performance simbiótica frente a la leguminosa *Vicia spp.*
- ✓ Comparar efectividad e infectividad de las cepas nativas respecto de la cepa de referencia para vicia, *R. leguminosarum* D70.
- ✓ Caracterizar taxonómicamente los aislamientos nativos mediante determinaciones genotípicas y fenotípicas.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### *3.1. Aislamiento de microorganismos simbiotes de Vicia spp.*

Para el desarrollo de este trabajo se partió de cepas previamente aisladas de nódulos de leguminosas herbáceas autóctonas del género *Vicia*, provenientes de tres localidades de la zona semiárida pampeana, Argentina (**Figura 1**). Los aislamientos fueron realizados en ensayos preliminares por el grupo de investigación que integran el proyecto global en el cual está enmarcado este trabajo de tesina, utilizando el método de la "planta trampa".



**Figura 1.** Mapa de la Provincia de La Pampa, en círculos rojos se indican las 3 zonas de las que fueron extraídas las plantas de vicia utilizadas para esta tesina (Victorica, General Acha y Anguil). Imagen obtenida de Google Maps con ediciones posteriores.

- Zona Anguil (36°32.316'S; 63°59.253'O):

Se obtuvieron 4 aislamientos que fueron rotulados de la siguiente manera: 54, 270, 271, 272.

- Zona Victorica (36°12.570'S; 65°24.738'O):

Se obtuvieron 29 aislamientos que fueron rotulados de la siguiente manera: V1, V2, V4, V6, V7, V8, V10, V11, V12, V13, V14, V17, V18, V19, V29, V30, V31, V32, V33, V34, V39, V42, V48, V50, V53, V54, V55, V57, V58.

- Zona General Acha (37°23.803'S; 64°33.718'O):

Se obtuvieron 16 aislamientos que fueron rotulados de la siguiente manera: 1b, 2b, 3, 4, 6, 7, 11b, 19a, 19b, 23b, 24b, 25b, 30b, 31, 32b, 38.

Además se utilizó la cepa *Rhizobium leguminosarum* D70 como microorganismo de referencia, dado que los biofertilizantes comerciales para vicia están formulados con esta cepa, aislada originalmente del noroeste de Argentina (NOA). La misma fue cedida gentilmente por INTA Castelar.

### **3.2. Conservación de los microorganismos**

Los métodos empleados para la preservación de las cepas fueron los propuestos por Hunter-Cevera (1996). Se determinaron en cada caso viabilidad, concentración celular, preservación de las características de los microorganismos. A partir de cultivos líquidos obtenidos a 28°C se llevaron a cabo dos métodos diferentes de conservación:

*Pico de flauta:* se sembraron tubos con medio YEM (Yeast Extract - Mannitol) sólido y se conservaron en heladera.

*Congelado:* en tubos tipo Eppendorf, se centrifugaron 1000µl de cultivo en medio de cultivo YEM (Yeast Extract – Mannitol) líquido, se retiraron 500µl de sobrenadante, y luego de homogeneizar el pellet se agregaron 500µl de Glicerol 40% (sustancia crioprotectora). Se conservaron en freezer a -20°C.

### **3.3. Evaluación de infectividad y efectividad de cepas nativas sobre plantas de vicia en escala invernadero**

Dado que para la formulación de biofertilizantes se requiere que las cepas sean eficientes desarrollándose en medios de cultivo y las dificultades presentadas por algunas de las cepas para su crecimiento en dichas condiciones, se llevó a cabo una selección de aislamientos del total de las cepas obtenidas. Las cepas seleccionadas corresponden 4 a



bacterias de la zona de Anguil (54, 270, 271, 272), 22 a la zona de Victorica (V1, V2, V4, V7, V10, V11, V12, V13, V14, V29, V30, V31, V32, V33, V34, V39, V42, V48, V53, V54, V55, V58) y 13 a la zona de General Acha (1b, 2b, 4, 6, 11b, 19a, 23b, 24b, 25b, 30b, 31, 32b, 38). Dichos aislamientos además fueron almacenados en el banco de cepas del grupo de investigación en el Departamento de Química, FCEyN – UNLPam.

Los ensayos fueron realizados inoculando las plantas, con inóculos desarrollados con las cepas seleccionadas, con la finalidad de determinar efectividad e infectividad, y por otro lado comparar estos resultados con ensayos de inoculación con la cepa de referencia *R. leguminosarum* D70.

3.3.1. Ensayos en plantas a escala invernadero: estos ensayos se llevaron a cabo de acuerdo a lo indicado por Vincent (1970) y Lopreto (1973). Los ensayos se realizaron en invernadero, en macetas estériles, utilizando como soporte una mezcla de suelo (obtenido del campus universitario) y vermiculita en una relación 70:30, el cual se esterilizó en 3 ciclos de 1 hora cada uno en autoclave a 121°C. Se sembraron 2 semillas por maceta, previamente esterilizadas y pregerminadas, y se inoculó cada maceta con cultivo líquido de cada uno de los aislamientos seleccionados, por cuadruplicado. Además se utilizaron 3 testigos, también por cuadruplicado, los cuales corresponden a testigo sin inóculo (control), testigo con la cepa de referencia *R.leguminosarum* D70 y testigo con adición de  $\text{NO}_3^-$  (fertilizada). Las plantas fueron regadas con solución de riego Fahraeus libre de nitrógeno (Fahraeus, 1957) (**Figura 2**).



**Figura 2.** Fotografía del ensayo a escala invernadero de plantas de vicia inoculadas con las cepas nativas, D70, fertilizadas y control.

La duración del ensayo, varía de acuerdo a la dinámica de funcionamiento nodular. En vicia, dado que la fijación biológica de nitrógeno (FBN) no es constante a lo largo de la ontogenia de la planta, se esperó hasta los 45-50 días desde la siembra. El número de días que requirió el proceso de recolección de las plantas derivó de la capacidad de procesar las

plantas de manera conservada, atendiendo siempre a que la totalidad de las plantas mantuvieran las mismas condiciones hídricas y estado fenológico.

3.3.2. Parámetros de crecimiento de plantas: para esta determinación se cuantificaron los siguientes parámetros fisiológicos (Newman, 1996):

- ✓ *Número de nódulos totales por planta:* recuento de nódulos de la raíz.
- ✓ *Peso fresco de la parte aérea:* se determinó por pesada directa de la parte aérea obtenida luego de separar la raíz.
- ✓ *Peso seco de la parte aérea:* una vez separada de la raíz, se guardó en un sobre de papel madera y se colocó en una estufa a 60°C, hasta que alcanzó peso constante.
- ✓ *Contenido de nitrógeno de parte aérea,* mediante el método de Kjeldahl (Bremner y Mulvaney, 1982) que se basa en la mineralización del nitrógeno orgánico de la muestra mediante una digestión con ácido sulfúrico concentrado. Para la determinación se pesó 0.1 g de muestra de parte aérea seca y molida sobre papel y se agregó 1.25 g de catalizador mixto (24 g de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y 1 g de óxido de mercurio amarillo), posteriormente se agregó el ácido sulfúrico y se dejaron digerir las muestras durante una hora. Luego se realizó la destilación y titulación en equipo automático Tecator Kjeltac Auto 1030 Analyzer, utilizando ácido bórico 0.1 N y HCl 0.104 N. El contenido porcentual de nitrógeno se calculó a través de las siguientes ecuaciones:

$$M \times N = \text{meq de N}$$

$$\text{Meq de N} \times 0.014 = G$$

Donde:

M: ml de HCl gastados en la valoración.

N: normalidad del HCl.

G: g de nitrógeno contenidos en 0.1 g de muestra.

Al referir esa cantidad a 100 g de muestra obtendremos el porcentaje de nitrógeno total.

### ***3.4. Caracterización genotípica de los aislamientos***

Uno de los abordajes experimentales más extendidos para evaluar variabilidad microbiana es determinar las huellas dactilares (fingerprint) genómicas de los microorganismos de interés. La rep-PCR es una técnica de tipificación en la que se utilizan

cebadores de ADN (primers BOX, ERIC, REP, etc.) que hibridan con elementos definidos dentro del ADN blanco y que se encuentran comúnmente repetidas dentro del genoma bacteriano (secuencias rep). Estos elementos son comunes en los organismos procariontes y se encuentran altamente conservados en cada generación. Con esta técnica, se amplifican las regiones que separan las secuencias rep, por lo que el polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y en la distancia entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones de ADN (Fernández-Cuenca, 2004). Luego de la amplificación por PCR, se realiza una electroforesis que forma un patrón de bandas, único para cada cepa y especie de bacteria (Versalovic et al, 1991), denominado fingerprint. Esta técnica, permite de manera simple y rápida, diferenciar con precisión, distintos grupos de bacterias, e inclusive, cepas diferentes en una misma especie.

#### 3.4.1. Acondicionamiento de los aislamientos para caracterización por BOX-PCR:

Partiendo de cultivos puros, en medio sólido TY (Tryptone - Yeast Extract), se tomaron 1-2 colonias aisladas y se lavaron con NaCl 1M estéril en un tubo tipo Eppendorf. El pellet fue resuspendido en agua milliQ (o destilada estéril, 100-200 microlitros) quedando una suspensión turbia, que fue almacenado a -20°C.

#### 3.4.2. Obtención de los perfiles BOX-PCR de las cepas nativas incluyendo la cepa de referencia:

Con el fin de comprobar si las cepas nativas difieren en sus fingerprints entre sí y con la cepa de referencia se llevó a cabo la caracterización molecular de cepas nativas e introducidas, realizada según la metodología de Versalovic et al (1994). Para este análisis, se realizó la extracción del ADN genómico de las bacterias, seguido por un ensayo de amplificación utilizando primers BOX. Luego se realizó la corrida electroforética en geles de agarosa al 1,5% en TBE, los cuales fueron revelados por exposición a UV utilizando como colorante 10 µL de SYBER SAFE cada 100 mL de solución. Los fingerprints obtenidos se analizaron por separado y en forma conjunta con el programa GelCompar II. El grado de similitud entre los fingerprints se determinó utilizando el coeficiente de correlación de Pearson, y los dendrogramas se construyeron siguiendo el método de pares de grupos con media aritmética (UPGMA).

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

Se realizaron ensayos en escala de erlenmeyers agitados, en agitador rotatorio de 250 rpm y 2,5 cm de excentricidad, en cuarto estufa a 28°C. Se seleccionó, en base al perfil

resultante de BOX-PCR, una cepa nativa de cada zona, a las que junto con la cepa comercial *R. leguminosarum* D70, se les determinaron parámetros fisiológicos de respuestas a las condiciones de medio y operación, considerando especialmente velocidad específica de crecimiento, tiempos de generación, periodos de latencia.

3.3.1. Medio de cultivo: Se estudiaron dos medios para optimizar el desarrollo del microorganismo en particular: medio de cultivo YEM (Yeast Extract – Mannitol) (Vincent, 1982), descrito en la **Tabla 1** y medio de cultivo TY (Tryptone - Yeast Extract) (Sambrook et al, 1989), descrito en la **Tabla 2**.

**Tabla 1:** Medio de cultivo YEM (Yeast Extract - Mannitol) utilizados en este trabajo, pH del medio 6.8-7.

Componentes	Concentración (g/l)
Manitol	10 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g/l
MgSO <sub>4</sub>	0.2 g/l
NaCl	0.1 g/l
Extracto de levadura	0.4 g/l

**Tabla 2:** Medio de cultivo TY (Tryptone - Yeast Extract) utilizados en este trabajo, pH del medio 6.8-7.2.

Componentes	Concentración (g/l)
Triptona	5 g/l
Extracto de levadura	3 g/l
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	0.8 g/l

3.3.2. Parámetros fisiológicos de crecimiento: en ambos medios de cultivo se determinaron parámetros tales como tiempo de latencia, velocidad específica de crecimiento y tiempo de generación (Ertola, et al., 2006).

Para la determinación de crecimiento microbiano, los diferentes aislamientos se sembraron en Erlenmeyer de 125 ml con 25 ml de medio de cultivo líquido, se cultivaron a 28°C, con 200 rpm de agitación, por aproximadamente 48 horas. Luego de realizar una observación al microscopio para comprobar la pureza del cultivo, se inocularon 2.5 ml en Erlenmeyer de 125 ml con 25 ml de medio líquido. Para cada aislamiento se realizaron triplicados en cada uno de los medios de cultivo utilizados.

El crecimiento celular se midió, a diferentes tiempos de incubación, en base a determinaciones de Densidad Óptica a una longitud de onda de 550 nm, utilizando un espectrofotómetro Metrolab 1700 UV-Visible de simple haz. Las mediciones se realizaron utilizando celdas de vidrio, usando como blanco medio de cultivo líquido estéril. La densidad óptica se expresó como Unidades de Densidad Óptica (UDO). Con los datos obtenidos se realizaron las curvas cinéticas de crecimiento correspondientes. Además se realizaron las observaciones microscópicas y la medición de pH en cada extracción de muestra, para evaluar la pureza de los cultivos.

Los parámetros cinéticos que se calcularon son: velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de generación (Tg), de acuerdo a las siguientes expresiones:

$$\mu = \ln (x/x_0)/t$$

$$Tg = \ln 2/\mu$$

Donde:

x: concentración final de células (expresada como UDO).

x<sub>0</sub>: concentración inicial de células (expresada como UDO).

t: intervalo de tiempo considerado.

### **3.6. Análisis estadísticos**

Para la realización de gráficos y análisis estadísticos se empleó el programa InfoStat versión libre (Di Rienzo, et al., 2016). Los datos fueron transformados de distinta manera dependiendo de la variable con el objeto de presentar una mayor homocedasticidad ( $\sqrt{x}$ ) para N° de nódulos,  $\ln(x)$  para biomasa y peso seco de parte aérea, y  $\sqrt{(x+0.5)}$  para contenido de N).

Para comparar la diferencia entre las medias de los tratamientos para cada uno de los parámetros analizados en el ensayo de plantas a escala invernadero, se realizó ANOVA de un factor. El test utilizado fue el método de la diferencia mínima significativa o LSD (*Least significant difference*) de Fisher, de contrastes para comparaciones múltiples, con un nivel de significancia del 5% ( $p < 0,05$ ). Su objetivo fundamental es comparar entre sí medias de tratamientos y se basa en la construcción de tests de hipótesis para la diferencia de cualquier par de medias basado en la distribución t (Universidad de Granada, 2017).

## 4. RESULTADOS

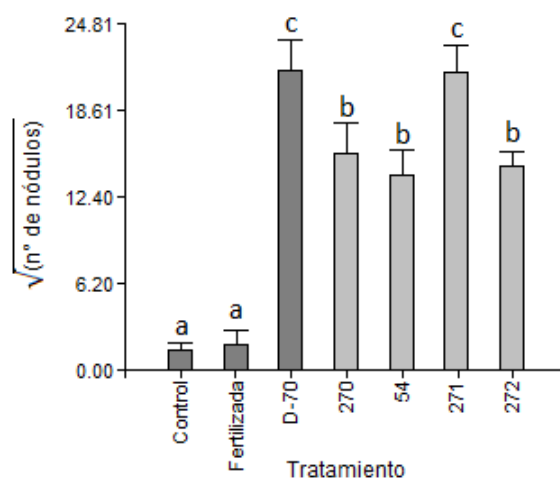
### *4.1. Evaluación de infectividad y efectividad de cepas nativas sobre plantas de vicia en escala invernadero*

La infectividad rizobiana se entiende como la capacidad de una cepa para nodular la raíz de la leguminosa específica, y depende de su capacidad de colonización, supervivencia y competitividad en la rizosfera. La misma fue evaluada mediante el recuento de nódulos totales por planta, en un ensayo con plantas de vicia a escala invernadero de acuerdo con las especificaciones mencionadas en Materiales y Métodos. En el mismo ensayo se evaluó peso fresco y peso seco de la parte aérea y contenido de nitrógeno a fin de determinar efectividad simbiótica de las cepas fijadoras de nitrógeno, definida justamente por el contenido de este elemento presente en la materia seca del vegetal, asumiendo una relación directa con el peso seco alcanzado.

Las tablas de ANOVA y Test LSD Fisher obtenidas del análisis de las variables medidas en este ensayo se presentan en el **ANEXO I**. Se realizaron primeramente con todos los datos juntos para tener una visión general y luego se procedió a procesar los datos de cada zona por separado para poder observar de mejor manera los datos arrojados por dichas tablas.

#### 4.1.1. Determinación de número de nódulos totales por planta

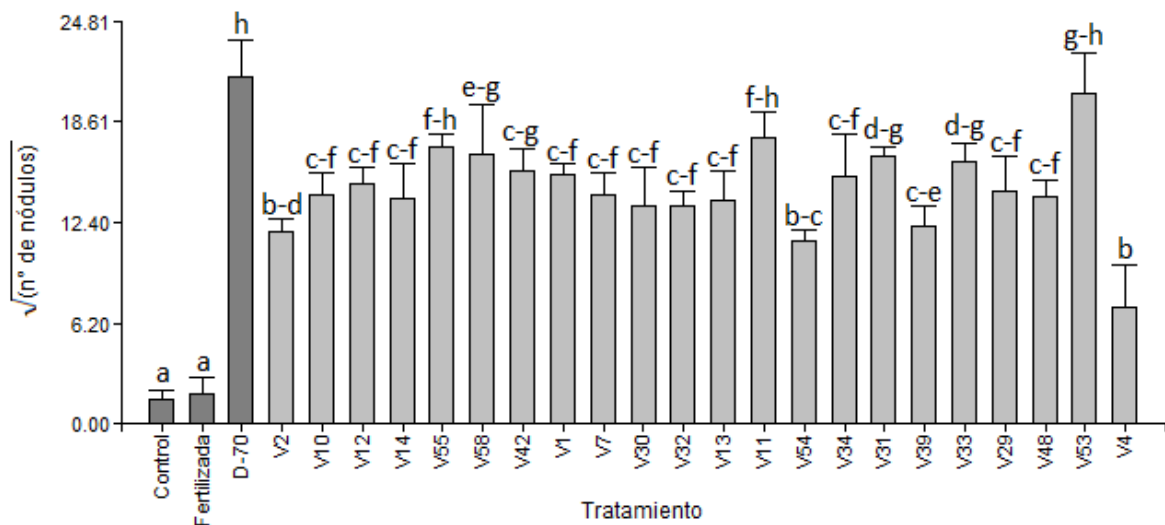
Todos los aislamientos nativos presentaron diferencias significativas con respecto a los testigos control y fertilizada, lo cual confirma su capacidad de nodular en plantas de vicia. Sólo uno de los aislamientos provenientes de Anguil (271) (**Figura 3**) y 3 de Victorica (V55, V11 y V53) (**Figura 4**) no mostraron diferencias significativas con *R. leguminosarum* D70, siendo el número de nódulos producido por el resto de los aislamientos de dichas zonas significativamente inferior a ésta. Distinto es el caso de las cepas de General Acha (**Figura 5**), de las cuales la mayoría, a



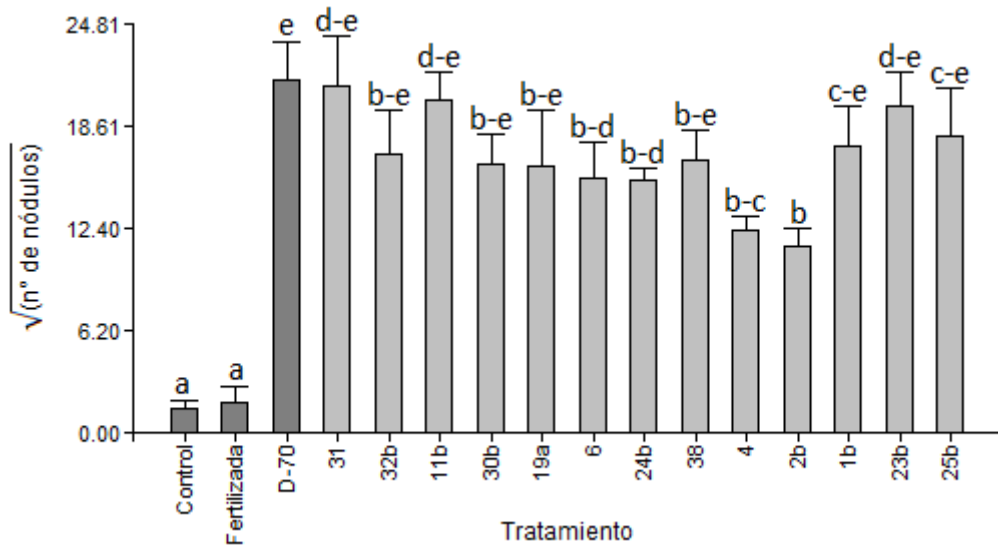
**Figura 3.** Número de nódulos por planta de *Vicia* spp. inoculadas con diferentes cepas nativas provenientes de la localidad de Anguil (54, 270, 271, 272), con la cepa comercial *R. leguminosarum* D70, fertilizada y control. Los valores corresponden a la media +/- error estándar de la transformación  $\sqrt{(\text{N}^\circ \text{ de nódulos})}$ . Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

excepción de los aislamientos 2b, 4, 24b y 6, presentó valores similares al de la cepa de referencia.

Durante el recuento de nódulo se pudo observar que, mientras que las plantas inoculadas con los aislamientos de Anguil y de Victorica presentaban nódulos pequeños distribuidos uniformemente en la raíz, las inoculadas con aislamientos provenientes de General Acha, así como con la cepa D70 tenían nódulos de mayor tamaño en forma de corona en la parte apical de la raíz.



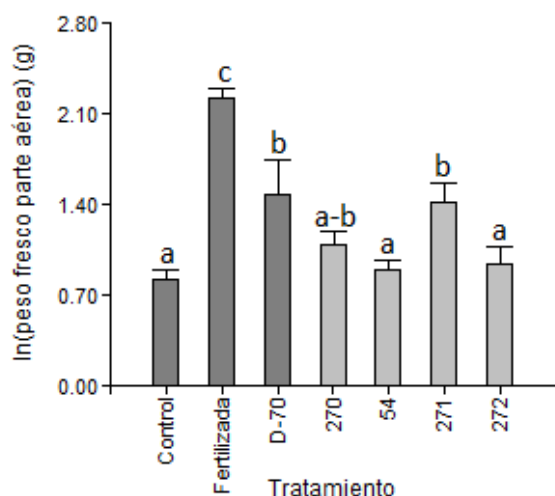
**Figura 4.** Número de nódulos por planta de *Vicia spp.* inoculadas con diferentes cepas nativas provenientes de la localidad de Victorica (V1, V2, V4, V7, V10, V11, V12, V13, V14, V29, V30, V31, V32, V33, V34, V39, V42, V48, V53, V54, V55, V58), con la cepa comercial *R. leguminosarum* D70, fertilizada y control. Los valores corresponden a la media  $\pm$  error estándar de la transformación  $\sqrt{N^\circ}$  de nódulos. Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).



**Figura 5.** Número de nódulos por planta de *Vicia spp.* inoculadas con diferentes cepas nativas provenientes de la localidad de General Acha (1b, 2b, 4, 6, 11b, 19a, 23b, 24b, 25b, 30b, 31, 32b, 38, 54), con la cepa comercial *R. leguminosarum* D70, fertilizada y control. Los valores corresponden a la media  $\pm$  error estándar de la transformación  $\sqrt{N^\circ}$  de nódulos. Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).



#### 4.1.2. Determinación de peso fresco de la parte aérea

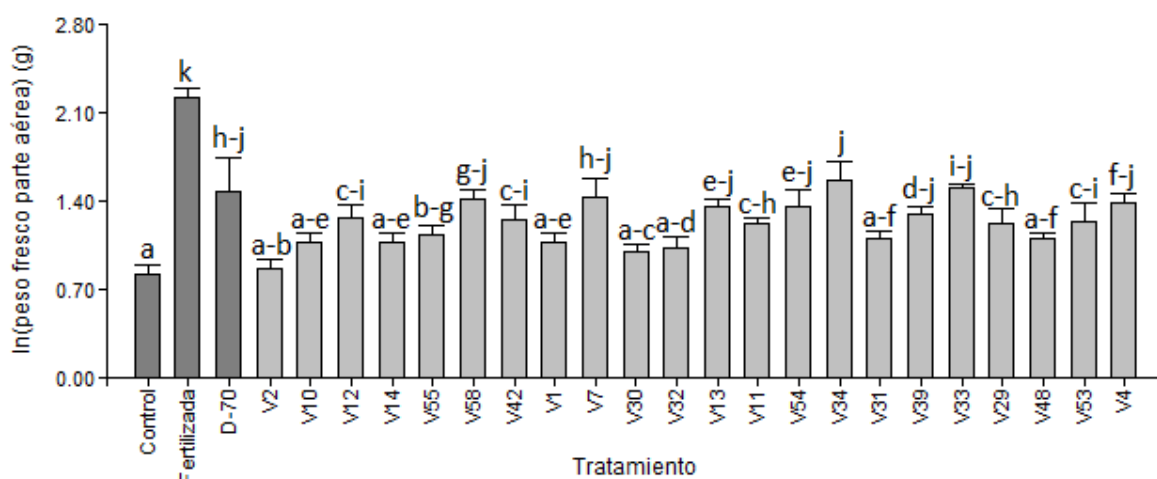


**Figura 6.** Peso fresco de parte aérea de plantas de *Vicia spp.* inoculadas con diferentes cepas nativas provenientes de la localidad de Anguil (54, 270, 271, 272), con la cepa comercial *R. leguminosarum* D70, fertilizada y control. Los valores corresponden a la media +/- error estándar de la transformación ln(peso fresco parte aérea). Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

Para las cepas de la zona de Anguil (**Figura 6**), todas presentaron valores de peso fresco significativamente inferiores que los de las plantas fertilizadas y sólo la cepa 271 alcanzó diferencias significativas respecto del control y valores similares a los de la cepa de referencia.

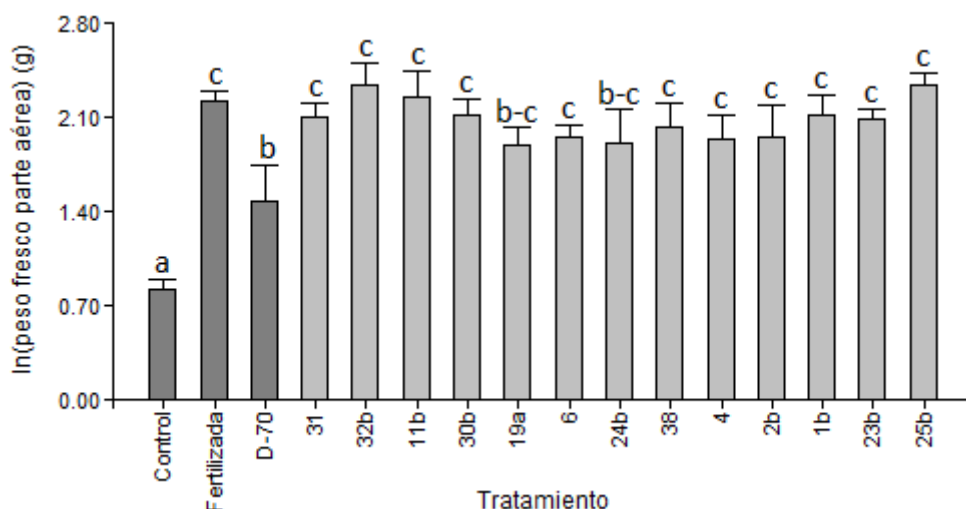
En el caso de las cepas nativas de Victorica, todas presentaron valores de peso fresco significativamente inferiores que los de las plantas fertilizadas, aproximadamente la mitad de los aislamientos alcanzaron valores comparables a los presentados por la

cepa D70, mientras que la otra mitad no presentó diferencias significativas respecto del control (**Figura 7**).



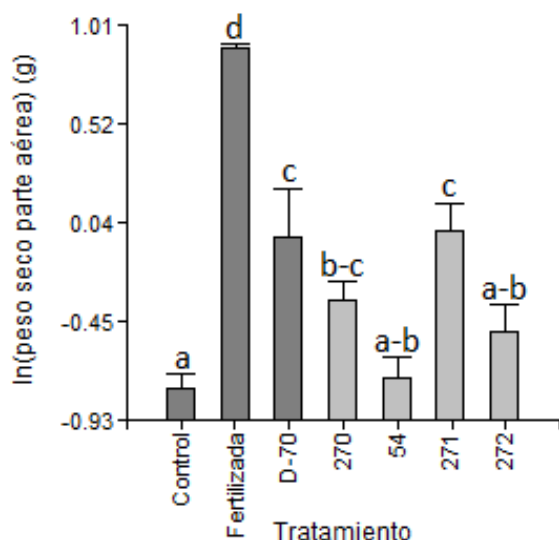
**Figura 7.** Peso fresco de parte aérea de plantas de *Vicia spp.* inoculadas con diferentes cepas nativas provenientes de la localidad de Victorica (V1, V2, V4, V7, V10, V11, V12, V13, V14, V29, V30, V31, V32, V33, V34, V39, V42, V48, V53, V54, V55, V58), con la cepa comercial *R. leguminosarum* D70, fertilizada y control. Los valores corresponden a la media +/- error estándar de la transformación ln(peso fresco parte aérea). Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

Todas las plantas inoculadas con aislamientos provenientes de la zona de General Acha alcanzaron diferencias significativas en el peso fresco de la parte aérea con respecto del control y, a excepción de dos cepas (19a y 24b), también de *R. leguminosarum* D70 (**Figura 8**). Además ninguno de ellos presentó diferencias significativas respecto del testigo fertilizado.



**Figura 8.** Peso fresco de parte aérea de plantas de *Vicia* spp. inoculadas con diferentes cepas nativas provenientes de la localidad de General Acha (1b, 2b, 4, 6, 11b, 19a, 23b, 24b, 25b, 30b, 31, 32b, 38, 54), con la cepa comercial *R. leguminosarum* D70, fertilizada y control. Los valores corresponden a la media +/- error estándar de la transformación ln(peso fresco parte aérea). Medias con una letra en común no

#### 4.1.3. Determinación de peso seco de parte aérea

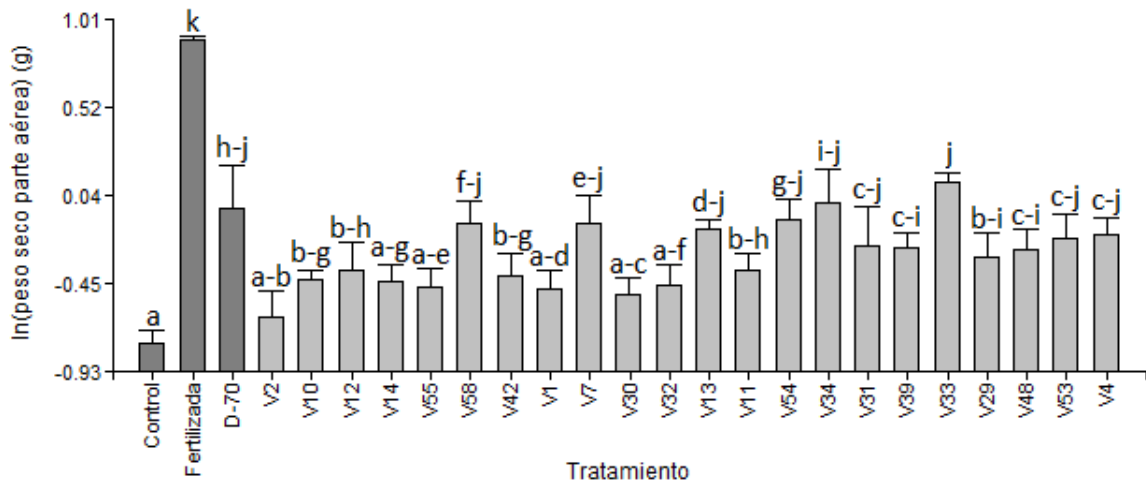


**Figura 9.** Peso seco de parte aérea de plantas de *Vicia* spp. inoculadas con diferentes cepas nativas provenientes de la localidad de Anguil (54, 270, 271, 272), con la cepa comercial *R. leguminosarum* D70, fertilizada y control. Los valores corresponden a la media +/- error estándar de la transformación ln(peso seco parte aérea). Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

Todas las plantas inoculadas con microorganismos nativos de Anguil presentaron valores de peso seco de parte aérea significativamente inferiores que los testigos fertilizados. Las cepas 54 y 272 no mostraron diferencias significativas respecto del control, mientras que 270 y 271 no mostraron diferencias respecto de la cepa de referencia D70 (**Figura 9**).

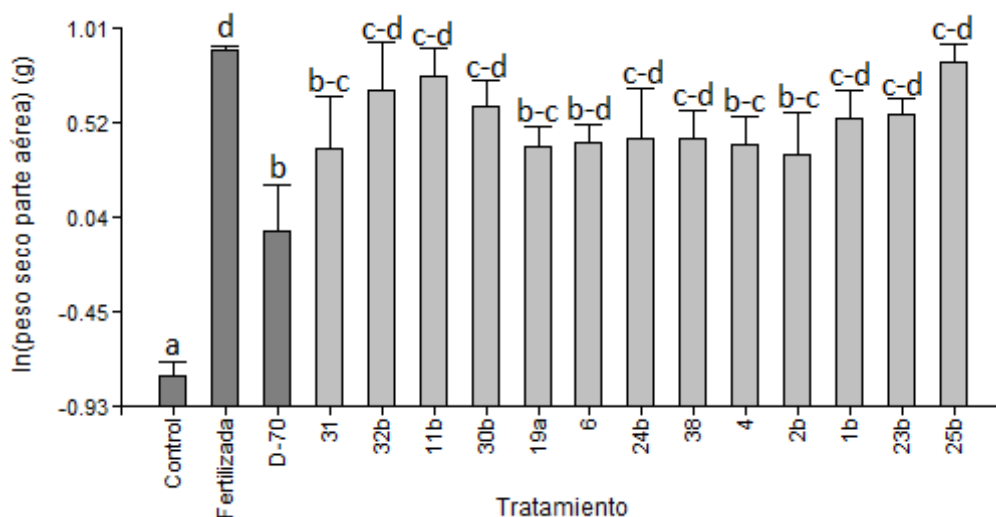
Las plantas de vicias fertilizadas también presentaron diferencias significativas respecto de aquellas inoculadas con cepas nativas de la zona

de Victorica. Similar a lo ocurrido para el parámetro peso fresco, los aislamientos V2, V30, V1, V55, V32 y V14 no muestran diferencias significativas respecto del control, y alrededor de la mitad de los aislamientos tampoco muestran diferencia comparadas con la cepa D70. Sólo en los tratamientos inoculados con las cepas V33 y V34 se observa una tendencia a valores superiores a los alcanzados por la cepa de referencia (**Figura 10**).



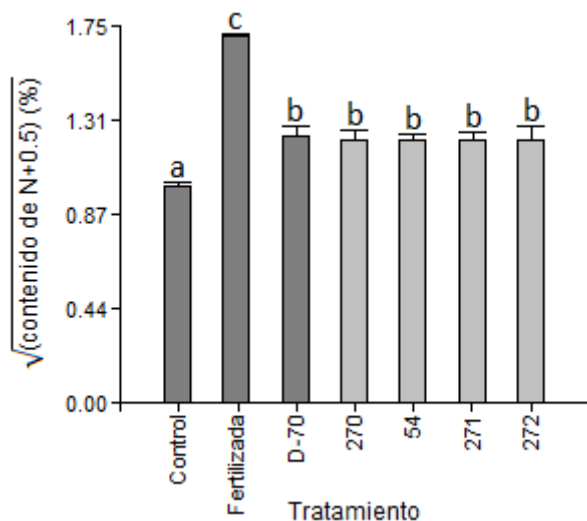
**Figura 10.** Peso seco de parte aérea de plantas de *Vicia spp.* inoculadas con diferentes cepas nativas provenientes de la localidad de Victorica (V1, V2, V4, V7, V10, V11, V12, V13, V14, V29, V30, V31, V32, V33, V34, V39, V42, V48, V53, V54, V55, V58), con la cepa comercial *R. leguminosarum* D70, fertilizada y control. Los valores corresponden a la media +/- error estándar de la transformación ln(peso seco parte aérea). Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

Distintos fueron los resultados observados con respecto a las plantas inoculadas con cepas originarias de General Acha (**Figura 11**), donde los aislamientos 25b, 11b, 32b, 30b, 23b, 1b, 24b 38 no presentaron diferencias significativas respecto de los tratamientos fertilizados pero sí lo hacen con respecto a *R. leguminosarum* D70. El resto de los aislamientos, si bien no presentan diferencias significativas comparadas con esta última cepa, sí muestran una tendencia hacia valores mayores presentando todas igual letra no compartida con la cepa de referencia.



**Figura 11.** Peso seco de parte aérea de plantas de *Vicia spp.* inoculadas con diferentes cepas nativas provenientes de la localidad de General Acha (1b, 2b, 4, 6, 11b, 19a, 23b, 24b, 25b, 30b, 31, 32b, 38, 54), con la cepa comercial *R. leguminosarum* D70, fertilizada y control. Los valores corresponden a la media +/- error estándar de la transformación  $\ln(\text{peso seco parte aérea})$ . Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

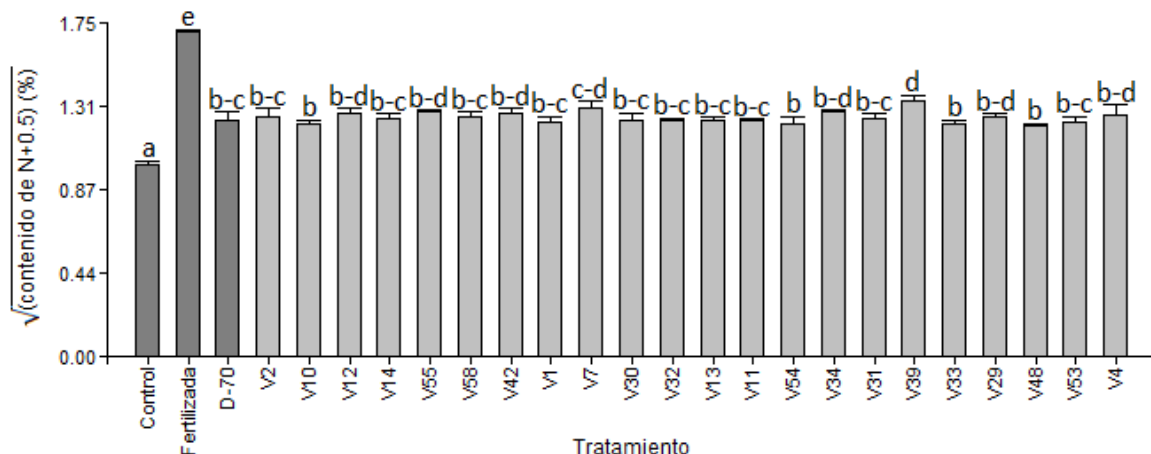
#### 4.1.4. Determinación de contenido de nitrógeno de parte aérea



**Figura 12.** Porcentaje de Nitrógeno de parte aérea de plantas de *Vicia spp.* inoculadas con diferentes cepas nativas provenientes de la localidad de Anguil (54, 270, 271, 272), con la cepa comercial *R. leguminosarum* D70, fertilizada y control. Los valores corresponden a la media +/- error estándar de la transformación  $\sqrt{(\text{contenido de N}+0.5)}$ . Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

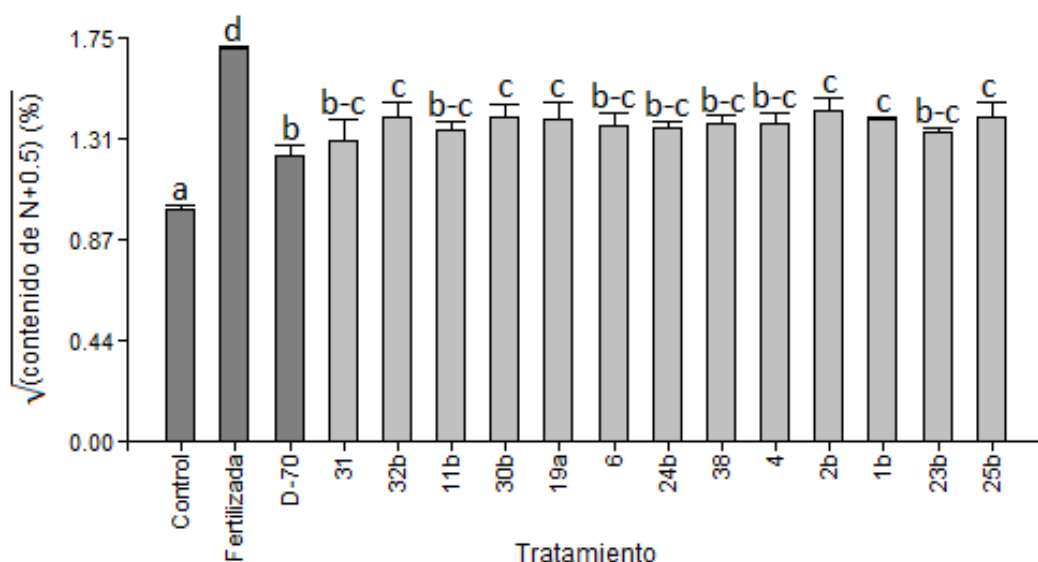
Los resultados obtenidos del análisis de los datos de la variable contenido de nitrógeno muestran que tanto los testigos control como fertilizado presentaron diferencias significativas con respecto al resto de los tratamientos.

En el caso de las cepas obtenidas de la zona de Anguil, ninguna presentó diferencias significativas comparada con la cepa de referencia D70 en el ensayo de invernadero (**Figura 12**), mientras que de los microorganismos aislados de la zona de Victorica, sólo la cepa V39 presenta diferencias significativas respecto de la cepa de referencia (**Figura 13**).



**Figura 13.** Porcentaje de Nitrógeno de parte aérea de plantas de *Vicia spp.* inoculadas con diferentes cepas nativas provenientes de la localidad de Victorica (V1, V2, V4, V7, V10, V11, V12, V13, V14, V29, V30, V31, V32, V33, V34, V39, V42, V48, V53, V54, V55, V58), con la cepa comercial *R. leguminosarum* D70, fertilizada y control. Los valores corresponden a la media +/- error estándar de la transformación  $\sqrt{(\text{contenido de N}+0.5)}$ . Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

En el grupo de aislamientos de la zona de General Acha se pudo observar que aproximadamente la mitad de las cepas ensayadas, si bien no tuvieron diferencias significativas con la cepa de referencia, mostraron una tendencia hacia valores mayores de contenido de N de la parte aérea, mientras que la otra mitad de los aislamientos (19a, 1b, 32b, 30b, 25b y 2b) alcanzaron diferencias significativas respecto de D70 (**Figura 14**).



**Figura 14.** Porcentaje de Nitrógeno de parte aérea de plantas de *Vicia spp.* inoculadas con diferentes cepas nativas provenientes de la localidad de General Acha (1b, 2b, 4, 6, 11b, 19a, 23b, 24b, 25b, 30b, 31, 32b, 38, 54), con la cepa comercial *R. leguminosarum* D70, fertilizada y control. Los valores corresponden a la media +/- error estándar de la transformación  $\sqrt{(\text{contenido de N}+0.5)}$ . Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

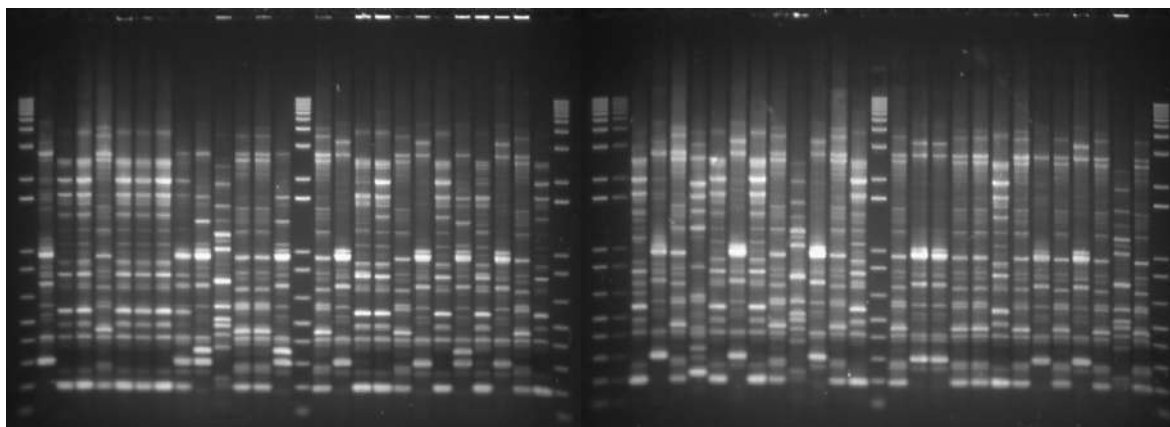
## **4.2. Caracterización taxonómica de los aislamientos obtenidos mediante determinaciones genotípicas y fenotípicas**

### **4.2.1 Caracterización genotípica de los aislamientos por BOX-PCR para determinar el número de cepas diferentes obtenidas**

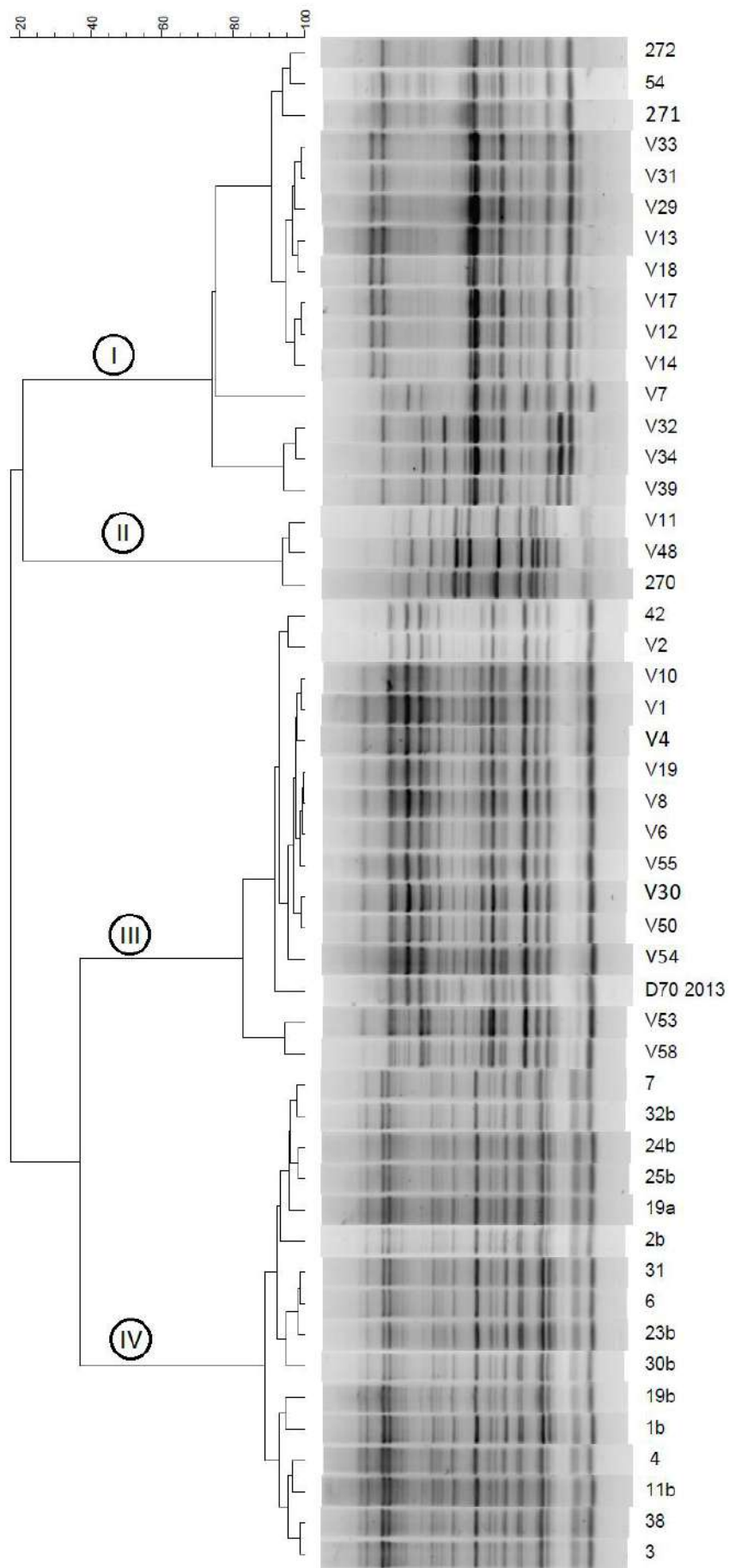
A fin de determinar el número de aislamientos diferentes obtenidos se realizó la técnica de BOX-PCR siguiendo la metodología descrita por Versalovic et al (1994). Se llevó a cabo el acondicionamiento de las cepas, la extracción de ADN, amplificación y corrida electroforética según lo indicado en Materiales y Métodos. Los geles obtenidos revelados por exposición a UV se muestran en la **Figura 15**. A partir del análisis de agrupamiento del dendrograma obtenido (**Figura 16**) se determinaron 4 grupos o clusters entre los aislamientos a un nivel de homología del 70%, y presentando entre ellos una gran variabilidad, con una homología de sólo 20%. Entre los clusters III y IV se puede observar un mayor grado de homología, cercano al 35%.

Dentro del grupo I se puede encontrar a 3 de las cepas provenientes de Anguil (54, 271 y 272) y aproximadamente la mitad de las nativas de Victorica, presentando entre ellas una variabilidad alrededor del 25%. El grupo II sólo estaba conformado por 3 cepas, de las cuales una provenía de Anguil (270) y dos de Victorica (V11 y V48). Por otra parte en el cluster III se encontraba la cepa de referencia *R. leguminosarum* D70 junto con la restante mitad de los aislamientos originarios de Victorica, mientras que el grupo IV estaba íntegramente conformado por todas las cepas provenientes de la zona de General Acha.

Dentro de cada grupo, los aislamientos mostraron fingerprints muy similares, por lo que se seleccionó una cepa representativa de cada grupo para evaluar sus características fisiológicas.



**Figura 15.** Geles de agarosa revelados por exposición UV obtenidos por corrida electroforética a partir de ADN de las cepas nativas y comercial amplificadas por BOX-PCR.



**Figura 16.** Dendrograma obtenido por BOX-PCR de los aislamientos obtenidos. Los números I, II, III y IV corresponden a los grupos genéticos definidos.

#### 4.2.2. Caracterización fenotípica de las cepas mediante determinaciones fisiológicas y morfológicas

Para caracterizar fenotípicamente los aislamientos, se determinaron parámetros fisiológicos tales como tiempo de latencia, tiempo de generación y velocidad específica de crecimiento (Ertola, et al., 2006).

Para determinar la cinética de crecimiento de los microorganismos en estudio se realizaron dos ensayos independientes con una diferencia de 10 horas con tres repeticiones cada uno. Los microorganismos se desarrollaron, según las condiciones indicadas anteriormente, en medio de cultivo líquido YEM y TY, descritos en Materiales y Métodos, y se realizaron las curvas cinéticas de crecimiento, a fin de determinar características fisiológicas de los aislamientos y evaluar su respuesta a distintos medios de cultivo.

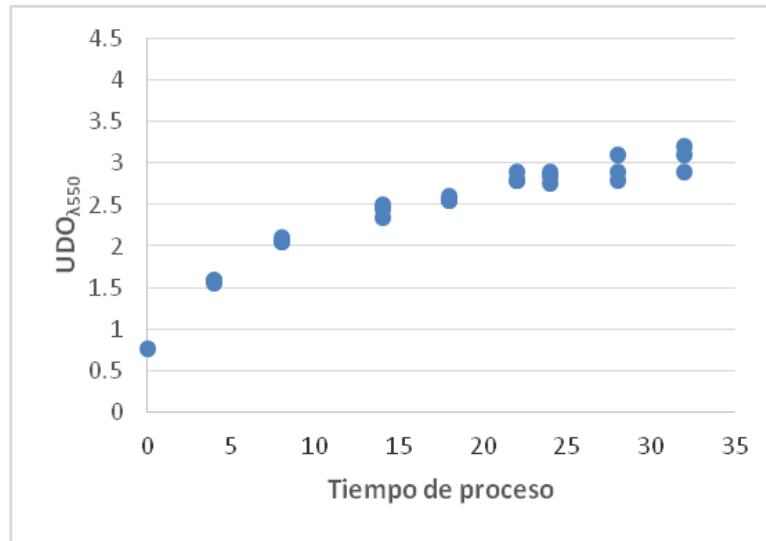
Los resultados obtenidos de los cálculos de velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de generación (Tg) se muestran en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Valores de velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de generación (Tg) las cepas seleccionadas 270, V39, 25b y D70 en los medios de cultivo YEM y TY.

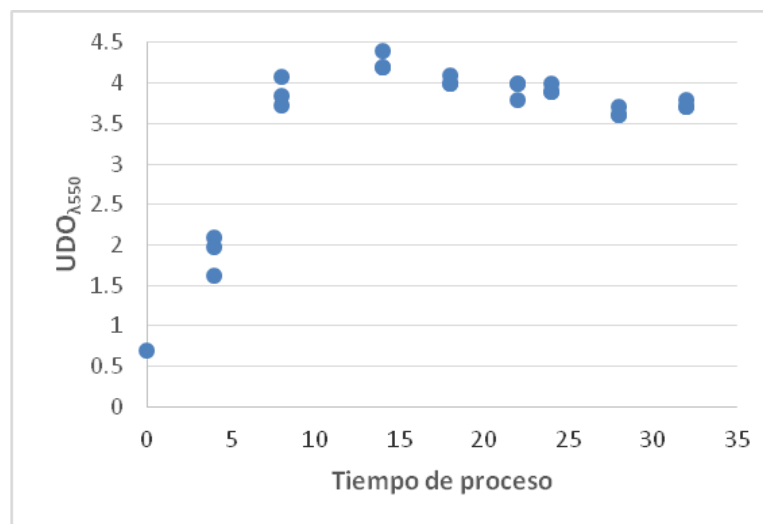
Cepa	Medio YEM		Medio TY	
	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	Tg (h)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	Tg (h)
<b>270</b>	0.126	5.513	0.214	3.243
<b>V39</b>	0.117	5.923	0.125	5.549
<b>25b</b>	0.165	4.192	0.155	4.466
<b>D70</b>	0.126	5.523	0.124	5.599

La cepa 270, ubicada en el grupo II y proveniente de la zona de Anguil, se determinó, en base al análisis de los parámetros cinéticos calculados, que se trata de microorganismos de crecimiento rápido, y presentó mayor velocidad específica de crecimiento y menor tiempo de generación creciendo en medio de cultivo TY. Además, en medio YEM alcanzó la etapa estacionaria aproximadamente a las 25 horas de proceso con valores de UDO cercanos a 3 (**Figura 17**), mientras que en TY lo hizo aproximadamente a las 15 horas de desarrollo, alcanzando valores de UDO entre 4 y 4.5 (**Figura 18**).



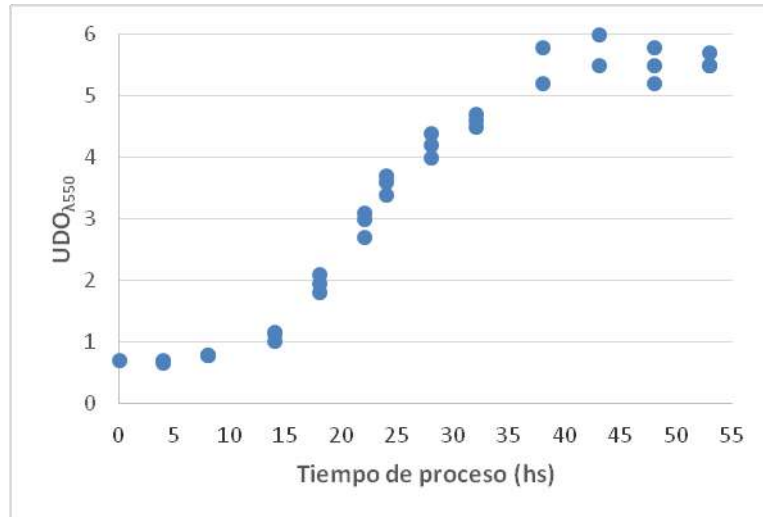


**Figura 17.** Curva de crecimiento de la cepa 270 desarrollada en medio líquido YEM.

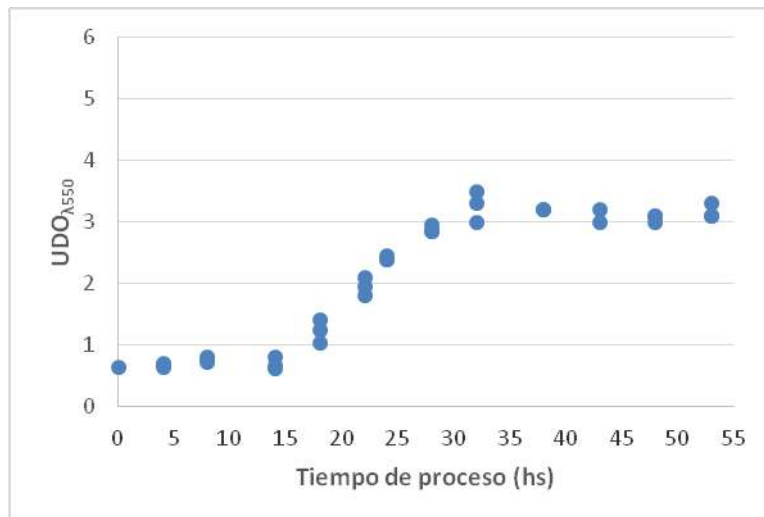


**Figura 18.** Curva de crecimiento de la cepa 270 desarrollada en medio líquido TY.

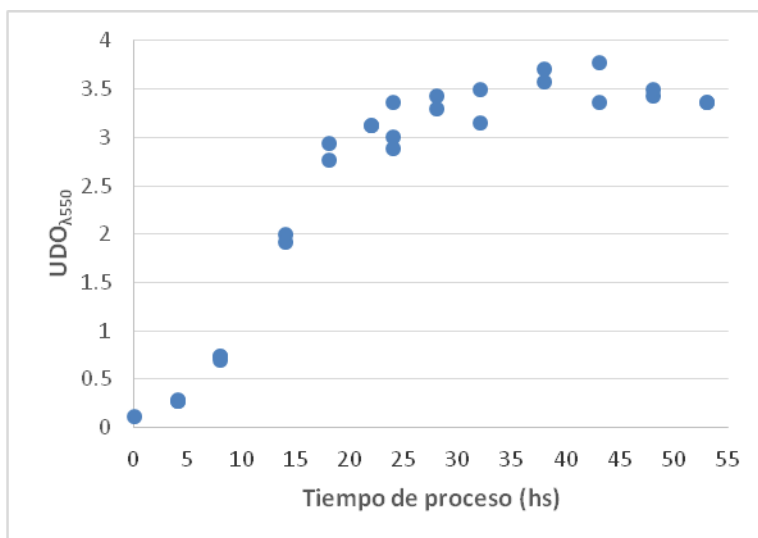
La cepa V39, ubicada en el grupo I y proveniente de la zona de Victorica, también se pudo clasificar dentro del grupo de microorganismos de crecimiento rápido, en base a los parámetros fisiológicos estudiados. En el caso particular de esta cepa presentó valores similares de velocidad específica de crecimiento y tiempo de generación similares respecto de cualquiera de los medios de cultivo ensayados. Sin embargo, en medio YEM alcanzó la etapa estacionaria aproximadamente a las 40 horas con valores de UDO cercanos a 5.5 (**Figura 19**), mientras que en TY lo hizo aproximadamente a las 32 horas y con valores de UDO cercanos a 3 (**Figura 20**). Además presentó un tiempo de latencia de aproximadamente 15 horas independientemente del medio de cultivo utilizado.



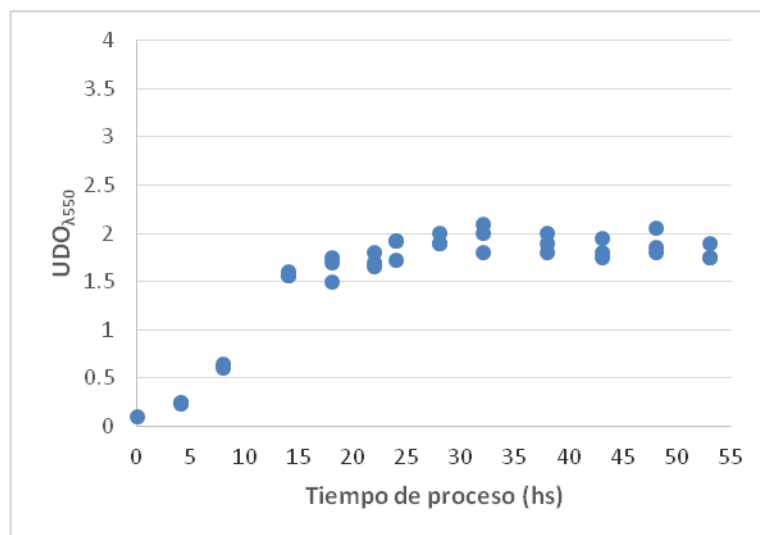
**Figura 19.** Curva de crecimiento de la cepa V39 desarrollada en medio liquido YEM.



**Figura 20.** Curva de crecimiento de la cepa V39 desarrollada en medio liquido TY.



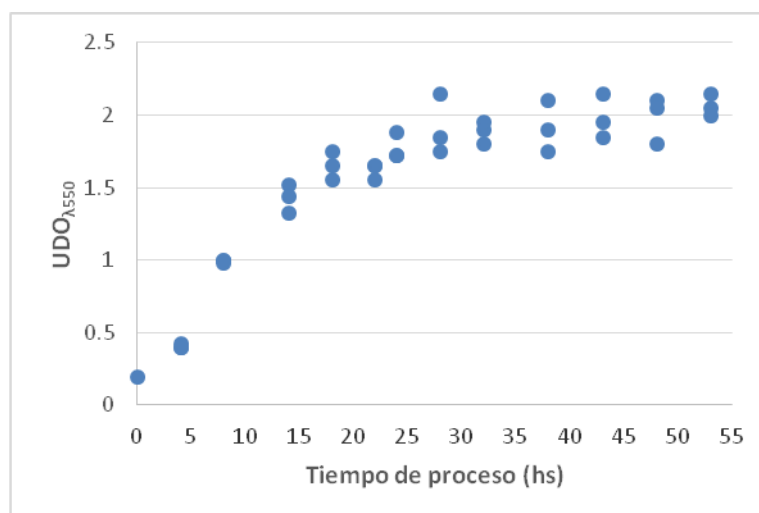
**Figura 21.** Curva de crecimiento de la cepa 25b desarrollada en medio liquido YEM.



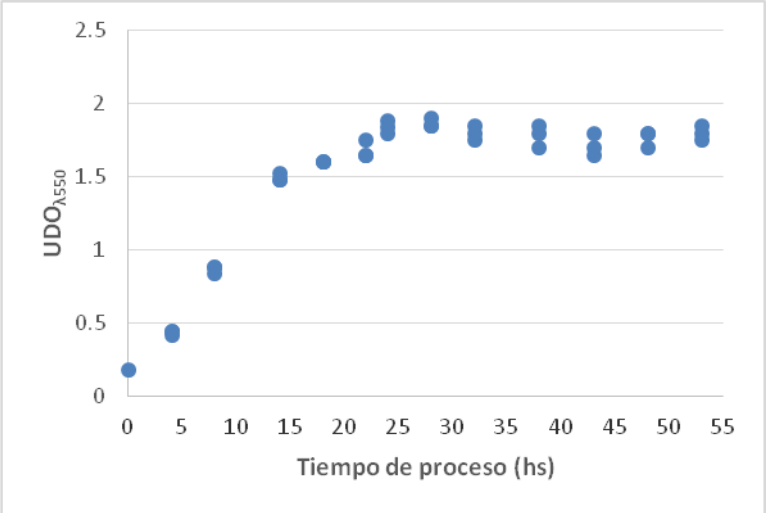
**Figura 22.** Curva de crecimiento de la cepa 25b desarrollada en medio liquido TY.

Los microorganismos del aislamiento 25b, ubicados en el grupo IV y proveniente de la zona de General Acha, pudieron ser también clasificados como de crecimiento rápido, con valores similares de  $\mu$  y Tg creciendo en ambos medios de cultivo. Sin embargo, en medio YEM alcanzó la etapa estacionaria aproximadamente a las 30 horas de proceso con valores de UDO cercanos a 3.5 (**Figura 21**), mientras que en medio TY lo hizo entre las 25-30 horas y con valores de UDO cercanos a 2 (**Figura 22**).

La cepa de referencia *R. leguminosarum* D70, ubicada en el grupo III, también clasificada como microorganismos de crecimiento rápido, ya que presentó similares valores de  $\mu$  y Tg en los dos medios de cultivo ensayados, alcanzando en ambos casos la etapa estacionaria de crecimiento aproximadamente a las 30 horas con valores de UDO cercanos a 2, siendo apenas inferiores en medio TY (**Figura 23 y 24**).



**Figura 23.** Curva de crecimiento de la cepa D70 desarrollada en medio liquido YEM.



**Figura 24.** Curva de crecimiento de la cepa D70 desarrollada en medio liquido TY.

## 5. DISCUSIÓN

Del análisis de los datos obtenidos del recuento de nódulos se pudo observar que, independientemente del número de nódulos, la posición de éstos en la raíz tenía influencia sobre los valores obtenidos en el resto de los parámetros analizados. De esta manera, las plantas que presentaban la mayor parte de los nódulos en corona (parte superior de la raíz) (**Figura 25**), mostraban valores más elevados tanto de peso seco como contenido de N de la parte aérea que aquellas que tenían nódulos dispersos a lo largo de toda la raíz. Esta



**Figura 25.** Nódulos en forma de corona en la parte apical de la raíz de una planta de vicia inoculada con la cepa nativa 25b proveniente de la zona de General Acha.

condición se presentaba principalmente en aquellas plantas que habían sido inoculadas con cepas provenientes de la zona de Gral. Acha, así como con la cepa de referencia D70.

Si bien los aislamientos provenientes de Anguil no presentaron valores significativamente superiores respecto de la cepa de referencia, podría esperarse que compitan más eficientemente en condiciones de campo, dado que han sido obtenidas de ambientes con condiciones edafoclimáticas similares a las de su potencial aplicación, teniendo en cuenta que la cepa de referencia *Rhizobium leguminosarum* D70 fue aislada del Noroeste Argentino (NOA).

Las cepas originarias de Victorica con mejor performance simbiótica son V7, V34 Y V39, ya que si bien no difieren significativamente de la cepa comercial (a excepción de V39 para la variable % de N), presentan tendencia hacia valores mayores tanto en biomasa (peso fresco y seco) como para contenido de N, lo cual es aún más promisorio a la hora de pensar en su potencial uso como biofertilizante en condiciones de campo, considerando que como demostraron Evans, et al. (1993), la interacción entre los tipos de suelos y las temperaturas afectan la supervivencia de los rizobios en el suelo y por lo tanto su disponibilidad para nodular cultivos, y las mencionadas cepas cuentan con la adaptación a las condiciones físico-químicas del suelo de la región.

En el caso de los aislamientos nativos de General Acha, si bien los datos analizados nos permiten inferir que cualquiera de estas cepas podría ser utilizada con el fin de aumentar la disponibilidad de N en suelos de la región en estudio, las cepas que presentan

una mejor performance simbiótica, y por lo tanto mayor potencial para la formulación de biofertilizantes son 25b, 30b y 32b, ya que presentan los mejores resultados, tanto de infectividad, peso fresco y peso seco de parte aérea, como en su capacidad de fijar nitrógeno. La totalidad de dichos aislamientos presentan aumentos significativos ( $p > 0.05$ ) respecto de la cepa de referencia D70 excepto en el número de nódulos y, para el caso de los parámetros peso fresco y peso seco, valores comparables con los alcanzados por los testigos fertilizados, por lo que sería de esperar resultados más favorables aún durante su aplicación a campo, dado por su condición de cepa nativa y su adaptación a la región semiárida pampeana.

Con respecto a los resultados obtenidos a partir del análisis del dendrograma de las cepas aisladas se puede afirmar que en los suelos de la región semiárida pampeana existe una alta diversidad de microorganismos capaces de nodular plantas de vicia, ya que los resultados muestran una similitud entre grupos de apenas un 20%. Estos resultados son compatibles con otros trabajos que evalúan diversidad de microorganismos infectivos de Vicia en suelo, donde han hallado más de una cepa capaz de nodular y, en algunos casos, no son microorganismos estrechamente relacionados (Tian et al, 2007; Chemining'wa y Vessey, 2006; Laguerre et al, 2003; Moschetti et al, 2005; Guzman Arrausi, 2011).

Con respecto a los aislamientos provenientes de General Acha, su agrupación dentro del dendrograma en un cluster exclusivo con una homología superior al 85%, relacionado con su origen geográfico, y una gran variabilidad con respecto a otros clusters, estaría sugiriendo la presencia de aislamientos con una corta distancia genotípica entre ellos y distanciados de *R. leguminosarum* D70, lo que sumado a su buena performance simbiótica evidenciaría la existencia de cepas altamente competitivas en los suelos de esta región, distintas de la cepa de referencia.

En relación a los estudios dirigidos al análisis de la cinética de crecimiento de las cepas seleccionadas, todos los aislamientos evaluados, fueron clasificados como microorganismos de crecimiento rápido, los cuales a excepción de la cepa 270, no mostraron diferencias en los parámetros evaluados respecto de los medios de cultivo ensayados, lo que indicaría que pueden utilizar con la misma eficiencia distintas fuentes de carbono, como la triptona y el manitol. Por el contrario, la cepa 270 presentaría una mayor eficiencia en medio TY, con triptona como principal fuente de carbono, ya que alcanzó valores de UDO más altos, mayores valores de  $\mu$  y menores tiempos de generación. Los resultados obtenidos de cinética del crecimiento de la cepa comercial *R. leguminosarum*

D70 son similares a los obtenidos por Guzman Arrausi (2011). Además sólo la cepa V39 mostró un período de latencia en ambos medios.

## **6. CONCLUSIÓN**

En el desarrollo de este trabajo se pudo determinar que:

✓ Todos los aislamientos de cepas nativas estudiados mostraron infectividad, ya que fueron capaces de nodular plantas de vicia bajo condiciones de invernadero.

✓ Tanto los aislamientos provenientes de la zona de Anguil como de Victorica no mostraron diferencias significativas en cuanto a la infectividad y efectividad en plantas de vicia con respecto de *Rhizobium leguminosarum* D70, utilizada para la formulación de inoculante para *Vicia*, si bien podrían esperarse resultados más favorables en condiciones de campo dada su condición de cepa nativa y su adaptación a las condiciones edafoclimáticas de la región semiárida pampeana.

✓ La mayor eficiencia en base a su performance simbiótica frente a la leguminosa *Vicia spp.* fue presentada por las cepas provenientes de la zona de Gral.Acha, muchas de cuales mostraron resultados superiores a los de la cepa de referencia para vicia, *R. leguminosarum* D70, por lo que serían las más recomendables para la formulación de un biofertilizante regional.

✓ En los suelos de la región semiárida pampeana existe una alta diversidad de microorganismos capaces de nodular en plantas de vicia, presentando una similitud entre grupos de apenas un 20%.

✓ Las cepas seleccionadas para evaluar cinética de crecimiento mostraron una cinética de crecimiento rápido que utilizan de igual manera como fuente de carbono triptona o manitol, con excepción de la cepa 270 que tendría mayor desarrollo en medio TY.



## **7. PERSPECTIVAS A FUTURO**

- ✓ Ensayo a campo para evaluar su infectividad y eficiencia en la fijación biológica de nitrógeno frente a las condiciones edafoclimáticas propias de la región semiárida pampeana, así como su capacidad de competir y/o convivir con otros microorganismos que puedan estar presentes en el suelo.
- ✓ Identificación genética de las cepas aisladas.
- ✓ Desarrollo de un biopreparado mediante el agregado de diferentes sustancias que tiendan a estabilizar las células y lograr adhesión a la semilla, a fin de garantizar el éxito del proceso de promoción del crecimiento de las plantas.
- ✓ Formulación de un biofertilizante regional como consorcio bacteriano a partir de los distintos aislamientos seleccionados.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**

Abd-Alla, M. H., El-Enany, A.-W. E., Nafady, N. A., Khalaf, D. M., y Morsy, F. M. (2014). Synergistic interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and arbuscular mycorrhizal fungi as a plant growth promoting biofertilizers for faba bean (*Vicia faba* L.) in alkaline soil. *Microbiological Research*. 169(1): 49–58.

Bedmar, E. J., J. González, C. Lluch y B. Rodelas. 2006. Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones. SEFIN. 328pp.

Bell, L. W., Bennett, R. G., Ryan, M. H., y Clarke, H. (2010). The potential of herbaceous native Australian legumes as grain crops: a review. *Renewable Agriculture and Food Systems*. 26(1): 72–91.

Bhattacharyya, P. N., y Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327–1350.

Bremner, J. y Mulvaney, C. 1982. Total nitrogen. En: *Methods of Soil Analysis*, part 2. *Agron. Monogr.* 9. 2nd ed. ASA and SSSA, Madison, WI . p.595-624.

Chemining'wa G.N y Vessey, J. K. (2006). The abundance and efficacy of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* in cultivated soils of the eastern canadian prairie. *Soil Biology and Biochemistry*. 38:294-302.

Danso, S. K. A. (1995). Assessment of biological nitrogen fixation. *Fertilizer Research*. 42:33-41.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

Doran, J. y Smith, M. S. (1991). Role of cover crops in nitrogen cycling. En: Hargrove, W.L., ed. 1991. *Cover Crops for Clean Water*. Ankeny, IA: Soil and Water Conservation Society. 85-90.

Ertola R., O. Yantorno y Mignone, C. (2006). *Microbiología Industrial*. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico de La Secretaria General de la Organización de Estados Americanos.

Estavillo, J. M., Rodriguez, M., y Gonzalez-Murua, C. (1996). Nitrogen losses by denitrification and leaching in grassland. The effect of cow slurry application. *Fertilizer Research*. 43(1): 197–201.

Evans, J., Wallace, C., y Dobrowolski, N. (1993). Interaction of soil type and temperature on the survival of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Soil Biology and Biochemistry*, 25(9), 1153–1160.

Fahraeus, G. (1957). The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass technique. *J. Gen. Microbiol.* 16: 374–381.

Fernández, R., Quiroga, A., y Noellemeyer, E. (2012). Cultivos de cobertura, ¿una alternativa viable para la región semiárida pampeana? *Ciencia Del Suelo*. 30(2): 137–150.

Fernandez-Cuenca F. (2004). Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 22(6): 355-360.

Ferreras, L., Magra, G., Besson, P., Kovalevski, E. y García, G. (2007). Indicadores de calidad física en suelos de la Región Pampeana Norte de Argentina bajo siembra directa. *Ciencia del suelo*. 25(2): 159-172.

Galantini, J. A., Landriscini, M. R., Iglesias, J. O., Miglierina, A. M., y Rosell, R. A. (2000). The effects of crop rotation and fertilization on wheat productivity in the Pampean semiarid region of Argentina. Nutrient balance, yield and grain quality. *Soil & Tillage Research*, 53(1): 137–144.

Gutschick, V. P. 1981. Evolved strategies un nitrogen acquisition by plants. *The American Naturalist*. 118: 607-637.

Guzman Arrausi, F. (2011). Estudios sobre competitividad y eficiencia de cepas nativas e introducidas de *Rhizobium leguminosarum* en la relación simbiótica con *Vicia sativa*. Tesina presentada para obtener el grado académico de Licenciado en Ciencias Biológicas. FCEyN - UNLPam

Hunter-Cevera J, Belt A. (1996). Maintaining cultures for biotechnology and industry. Academic Press, Inc.

Interrante, S. M., Singh, R., Anowarul Islam, M., Stein, J. D., Young, C. A., y Butler, T. J. (2011). Effectiveness of *Sinorhizobium* inoculants on annual medics. *Crop Science*. 51(5): 2249–2255.

Laguerre, G., P. Louvrier, M. Allard y Amarger, N. (2003). Compatibility of Rhizobial Genotypes within Natural Populations of *Rhizobium leguminosarum* Biovar *viciae* for Nodulation of Host Legumes. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(4): 2276–2283

Lopreto, C.P., Mazza, L.A. y Balatti, A.P. (1973). Producción de inoculantes para soja. *Revista Facultad de Agronomía*. La Plata. 49: 201-212.

Lucero, C. T. (2014). Recolección in situ de *Rhynchosia*, domesticación y aislamiento de microorganismos simbioses. Tesina presentada para obtener el grado académico de Licenciado en Química. FCEyN – UNLPam.

Moschetti, G., Peluso, A. L., Protopapa, A., Anastasio, M., Pepe, O. y Defez, R. (2005). Use of nodulation pattern, stress tolerance, nodC gene amplification, RAPD-PCR and RFLP–16S rDNA analysis to discriminate genotypes of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Systematic and Applied Microbiology* 28 (2005) 619–631

Newman, E.I. (1996). A method of estimating the total length of root in a sample. *Journal of Applied Ecology*. 3: 139-145.

Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E. y Bedmar, E. J. (2015) Bacterial Associations with Legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34: 17-42

Rebora, C., Antonini, C., y Ibarguren, L. (2013). Unidad 2: Forrajeras fabaceas. Género *Vicia*. [http://campus.fca.uncu.edu.ar/pluginfile.php/19728/mod\\_resource/content/0/G%C3%A9nero%20Vicia%20apunte%202013.pdf](http://campus.fca.uncu.edu.ar/pluginfile.php/19728/mod_resource/content/0/G%C3%A9nero%20Vicia%20apunte%202013.pdf)

Reicosky, D. C. y Archer, D. W. (9-12 de Agosto de 2005). Cuantificación agronómica del aumento de la materia orgánica del suelo en siembra directa. En: *Actas del Congreso de AAPRESID XIII*, Ciudad de Rosario, Argentina. pp. 51-60.

Risser, P. G. y Parton W. J. (1982). Ecosystem analysis of the tallgrass prairie: Nitrogen cycle. *Ecology*. 63: 1342-1351.

Rochester, I. y Peoples, M. (2005). Growing vetches (*Vicia villosa* Roth) in irrigated cotton systems: inputs of fixed N, N fertilizer savings and cotton productivity. *Plant and Soil*. 271:251-264

Sadowsky, M. J., y Graham, P. H. (1998). Chapter 8: Soil Biology of the Rhizobiaceae. En: Spaink, H.P., Kondorosi, A. y Hooykaas, P.J.J. ed. *The Rhizobiaceae*, 155–172. (Kluwer: Dordrecht, The Netherlands).

Sambrook J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sainju, U.M. y Singh, B.P. (2008). Nitrogen storage with cover crops and nitrogen fertilization in tilled and nontilled soils. *Agron. J.* 100:619-627

Tian, C. F., Wang E. T., Han T. X., Sui X. H. y Chen W. X. (2007). Genetic diversity of rhizobia associated with *Vicia faba* in three ecological regions of China. *Archives of Microbiology* 188: 273–282

Universidad de Granada. Capítulo 3, Comparaciones múltiples. <http://www.ugr.es/~bioestad/guiaspss/practica7/ArchivosAdjuntos/ComparacionesMultiples.pdf> Visitado el 12/09/2017.

Van Cauwenberghe, J., Michiels, J., y Honnay, O. (2015). Effects of local environmental variables and geographical location on the genetic diversity and composition of *Rhizobium leguminosarum* nodulating *Vicia cracca* populations. *Soil Biology and Biochemistry*, 90: 71–79.

Vanzolini, J. I. y Galantini, J. A. (2013). Capítulo 10: Cultivos de cobertura. En *Vicias: Bases agronómicas para el manejo en la Región Pampeana*. Ediciones INTA, Argentina. pp. 233-250.

Versalovic J., Koeuth, T. y Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19(24): 6823-6831.

Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F. J. y Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Meth. Mol. Cell. Biol.* 5: 25-40.

Vincent, J.M. (1970). *A manual for the practical study of the root nodule bacteria*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Vincent J .M. (1982). *Nitrogen Fixation in Legumes*. Academic Press Australia. 288 pp.

Vitousek, P. M. y R. W. (1991). Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur?. *Biogeochemistry.* 13:87-115

**ANEXO I:** tablas de ANOVA y Test LSD Fisher obtenidas del análisis de las variables medidas en el ensayo en invernadero

- Determinación de número de nódulos totales por planta: transformación  $\sqrt{(x)}$

Análisis de la varianza				
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
raiz(x)	168	0.62	0.50	25.15

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2895.50	41	70.62	5.03	<0.0001
Tratamiento	2895.50	41	70.62	5.03	<0.0001
Error	1768.49	126	14.04		
Total	4663.99	167			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=5.24252  
 Error: 14.0356 gl: 126

Tratamiento	Medias	n	E.E.
Control	1.45	4	1.87 A
Fertilizada	1.80	4	1.87 A
V4	7.15	4	1.87 B
2b	11.27	4	1.87 B C
V54	11.31	4	1.87 B C
V2	11.81	4	1.87 B C D
V39	12.20	4	1.87 B C D E
4	12.29	4	1.87 B C D E
V30	13.41	4	1.87 C D E F
V32	13.43	4	1.87 C D E F
V13	13.76	4	1.87 C D E F
V14	13.85	4	1.87 C D E F
54	13.94	4	1.87 C D E F
V48	14.01	4	1.87 C D E F
V10	14.06	4	1.87 C D E F
V7	14.15	4	1.87 C D E F
V29	14.31	4	1.87 C D E F
272	14.60	4	1.87 C D E F
V12	14.79	4	1.87 C D E F G
V34	15.20	4	1.87 C D E F G H
24b	15.31	4	1.87 C D E F G H
V1	15.34	4	1.87 C D E F G H
6	15.49	4	1.87 C D E F G H
270	15.53	4	1.87 C D E F G H
V42	15.61	4	1.87 C D E F G H
V33	16.17	4	1.87 C D E F G H I
19a	16.17	4	1.87 C D E F G H I
30b	16.25	4	1.87 C D E F G H I J
V31	16.49	4	1.87 C D E F G H I J
38	16.58	4	1.87 D E F G H I J
V58	16.62	4	1.87 D E F G H I J
32b	16.93	4	1.87 D E F G H I J
V55	17.04	4	1.87 D E F G H I J
1b	17.43	4	1.87 E F G H I J
V11	17.62	4	1.87 F G H I J
25b	17.96	4	1.87 F G H I J
23b	19.85	4	1.87 G H I J
11b	20.24	4	1.87 H I J
V53	20.34	4	1.87 H I J
31	21.07	4	1.87 I J
271	21.30	4	1.87 I J
D-70	21.44	4	1.87 J

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Análisis de la varianza					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
raiz(x)	100	0.70	0.61	24.65	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2039.35	24	84.97	7.42	<0.0001
Tratamiento	2039.35	24	84.97	7.42	<0.0001
Error	859.32	75	11.46		
Total	2898.67	99			
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=4.76809					
Error: 11.4577 gl: 75					
Tratamiento	Medias	n	E.E.		
Control	1.45	4	1.69	A	
Fertilizada	1.80	4	1.69	A	
V4	7.15	4	1.69	B	
V54	11.31	4	1.69	B	C
V2	11.81	4	1.69	B	C D
V39	12.20	4	1.69	C	D E
V30	13.41	4	1.69	C	D E F
V32	13.43	4	1.69	C	D E F
V13	13.76	4	1.69	C	D E F
V14	13.85	4	1.69	C	D E F
V48	14.01	4	1.69	C	D E F
V10	14.06	4	1.69	C	D E F
V7	14.15	4	1.69	C	D E F
V29	14.31	4	1.69	C	D E F
V12	14.79	4	1.69	C	D E F
V34	15.20	4	1.69	C	D E F
V1	15.34	4	1.69	C	D E F
V42	15.61	4	1.69	C	D E F G
V33	16.17	4	1.69		D E F G
V31	16.49	4	1.69		D E F G
V58	16.62	4	1.69		E F G
V55	17.04	4	1.69		F G H
V11	17.62	4	1.69		F G H
V53	20.34	4	1.69		G H
D-70	21.44	4	1.69		H
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)					

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
raiz(x)	28	0.88	0.84	25.82

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1635.17	6	272.53	24.71	<0.0001
Tratamiento	1635.17	6	272.53	24.71	<0.0001
Error	231.63	21	11.03		
Total	1866.79	27			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=4.88374  
 Error: 11.0298 gl: 21

Tratamiento	Medias	n	E.E.
Control	1.45	4	1.66 A
Fertilizada	1.80	4	1.66 A
54	13.94	4	1.66 B
272	14.60	4	1.66 B
270	15.53	4	1.66 B
271	21.30	4	1.66 C
D-70	21.44	4	1.66 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
raiz(x)	64	0.72	0.63	27.54

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2129.94	15	142.00	8.22	<0.0001
Tratamiento	2129.94	15	142.00	8.22	<0.0001
Error	829.46	48	17.28		
Total	2959.40	63			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=5.91011  
 Error: 17.2805 gl: 48

Tratamiento	Medias	n	E.E.
Control	1.45	4	2.08 A
Fertilizada	1.80	4	2.08 A
2b	11.27	4	2.08 B
4	12.29	4	2.08 B C
24b	15.31	4	2.08 B C D
6	15.49	4	2.08 B C D
19a	16.17	4	2.08 B C D E
30b	16.25	4	2.08 B C D E
38	16.58	4	2.08 B C D E
32b	16.93	4	2.08 B C D E
1b	17.43	4	2.08 C D E
25b	17.96	4	2.08 C D E
23b	19.85	4	2.08 D E
11b	20.24	4	2.08 D E
31	21.07	4	2.08 D E
D-70	21.44	4	2.08 E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)



- Determinación de peso fresco de parte aérea: transformación ln(x)

Análisis de la varianza					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
ln(x)	168	0.82	0.76	16.81	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	35.31	41	0.86	13.64	<0.0001
Tratamiento	35.31	41	0.86	13.64	<0.0001
Error	7.96	126	0.06		
Total	43.27	167			
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.35168					
Error: 0.0632 gl: 126					
Tratamiento	Medias	n	E.E.		
Control	0.82	4	0.13	A	
V2	0.86	4	0.13	A	
54	0.89	4	0.13	A	B
272	0.93	4	0.13	A	B C
V30	0.99	4	0.13	A	B C D
V32	1.03	4	0.13	A	B C D E
V1	1.07	4	0.13	A	B C D E F
V14	1.07	4	0.13	A	B C D E F
V10	1.08	4	0.13	A	B C D E F
270	1.08	4	0.13	A	B C D E F
V31	1.10	4	0.13	A	B C D E F G
V48	1.11	4	0.13	A	B C D E F G
V55	1.13	4	0.13	A	B C D E F G H
V29	1.21	4	0.13		B C D E F G H I
V11	1.22	4	0.13		B C D E F G H I
V53	1.24	4	0.13		B C D E F G H I
V42	1.26	4	0.13		C D E F G H I
V12	1.26	4	0.13		C D E F G H I
V39	1.30	4	0.13		D E F G H I
V54	1.35	4	0.13		E F G H I
V13	1.35	4	0.13		E F G H I
V4	1.38	4	0.13		E F G H I
V58	1.41	4	0.13		F G H I
271	1.42	4	0.13		F G H I
V7	1.43	4	0.13		G H I
D-70	1.47	4	0.13		H I
V33	1.51	4	0.13		I
V34	1.56	4	0.13		I J
19a	1.89	4	0.13		J K
24b	1.90	4	0.13		J K
4	1.94	4	0.13		K L
6	1.95	4	0.13		K L
2b	1.95	4	0.13		K L
38	2.03	4	0.13		K L M
23b	2.08	4	0.13		K L M
31	2.10	4	0.13		K L M
1b	2.11	4	0.13		K L M
30b	2.12	4	0.13		K L M
Fertilizada	2.22	4	0.13		K L M
11b	2.25	4	0.13		L M
25b	2.34	4	0.13		M
32b	2.35	4	0.13		M

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Análisis de la varianza					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
ln(x)	100	0.70	0.60	16.60	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7.45	24	0.31	7.13	<0.0001
Tratamiento	7.45	24	0.31	7.13	<0.0001
Error	3.27	75	0.04		
Total	10.72	99			
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.29398					
Error: 0.0436 gl: 75					
Tratamiento	Medias	n	E.E.		
Control	0.82	4	0.10	A	
V2	0.86	4	0.10	A	B
V30	0.99	4	0.10	A	B C
V32	1.03	4	0.10	A	B C D
V1	1.07	4	0.10	A	B C D E
V14	1.07	4	0.10	A	B C D E
V10	1.08	4	0.10	A	B C D E
V31	1.10	4	0.10	A	B C D E F
V48	1.11	4	0.10	A	B C D E F
V55	1.13	4	0.10	B	C D E F G
V29	1.21	4	0.10		C D E F G H
V11	1.22	4	0.10		C D E F G H
V53	1.24	4	0.10		C D E F G H I
V42	1.26	4	0.10		C D E F G H I
V12	1.26	4	0.10		C D E F G H I
V39	1.30	4	0.10		D E F G H I J
V54	1.35	4	0.10		E F G H I J
V13	1.35	4	0.10		E F G H I J
V4	1.38	4	0.10		F G H I J
V58	1.41	4	0.10		G H I J
V7	1.43	4	0.10		H I J
D-70	1.47	4	0.10		H I J
V33	1.51	4	0.10		I J
V34	1.56	4	0.10		J
Fertilizada	2.22	4	0.10		K
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)					

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
ln(x)	28	0.78	0.71	22.46

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5.84	6	0.97	12.10	<0.0001
Tratamiento	5.84	6	0.97	12.10	<0.0001
Error	1.69	21	0.08		
Total	7.53	27			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.41703

Error: 0.0804 gl: 21

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
Control	0.82	4	0.14	A
54	0.89	4	0.14	A
272	0.93	4	0.14	A
270	1.08	4	0.14	A B
271	1.42	4	0.14	B
D-70	1.47	4	0.14	B
Fertilizada	2.22	4	0.14	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
ln(x)	64	0.62	0.51	16.39

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8.33	15	0.56	5.33	<0.0001
Tratamiento	8.33	15	0.56	5.33	<0.0001
Error	5.01	48	0.10		
Total	13.34	63			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.45912

Error: 0.1043 gl: 48

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
Control	0.82	4	0.16	A
D-70	1.47	4	0.16	B
19a	1.89	4	0.16	B C
24b	1.90	4	0.16	B C
4	1.94	4	0.16	C
6	1.95	4	0.16	C
2b	1.95	4	0.16	C
38	2.03	4	0.16	C
23b	2.08	4	0.16	C
31	2.10	4	0.16	C
1b	2.11	4	0.16	C
30b	2.12	4	0.16	C
Fertilizada	2.22	4	0.16	C
11b	2.25	4	0.16	C
25b	2.34	4	0.16	C
32b	2.35	4	0.16	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

- Determinación de peso seco de parte aérea: transformación ln(x)

Análisis de la varianza					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
ln(x)	168	0.78	0.71	1176.57	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	34.93	41	0.85	10.88	<0.0001
Tratamiento	34.93	41	0.85	10.88	<0.0001
Error	9.87	126	0.08		
Total	44.80	167			
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.39160					
Error: 0.0783 gl: 126					
Tratamiento	Medias	n	E.E.		
Control	-0.78	4	0.14	A	
54	-0.72	4	0.14	A	B
V2	-0.64	4	0.14	A	B C
V30	-0.50	4	0.14	A	B C D
272	-0.50	4	0.14	A	B C D E
V1	-0.48	4	0.14	A	B C D E F
V55	-0.47	4	0.14	A	B C D E F
V32	-0.46	4	0.14	A	B C D E F
V14	-0.44	4	0.14	A	B C D E F
V10	-0.43	4	0.14	A	B C D E F G
V42	-0.40	4	0.14	A	B C D E F G
V12	-0.38	4	0.14		B C D E F G H
V11	-0.37	4	0.14		B C D E F G H
270	-0.34	4	0.14		B C D E F G H
V29	-0.30	4	0.14		C D E F G H
V48	-0.26	4	0.14		C D E F G H I
V39	-0.25	4	0.14		C D E F G H I
V31	-0.24	4	0.14		D E F G H I
V53	-0.20	4	0.14		D E F G H I
V4	-0.18	4	0.14		D E F G H I
V13	-0.15	4	0.14		D E F G H I
V7	-0.12	4	0.14		D E F G H I
V58	-0.11	4	0.14		E F G H I
V54	-0.10	4	0.14		F G H I
D-70	-0.03	4	0.14		G H I
271	-0.01	4	0.14		H I J
V34	-4.4E-03	4	0.14		H I J
V33	0.11	4	0.14		I J K
2b	0.36	4	0.14		J K L
31	0.39	4	0.14		K L M
19a	0.40	4	0.14		K L M
4	0.41	4	0.14		K L M
6	0.42	4	0.14		K L M
38	0.44	4	0.14		K L M N
24b	0.45	4	0.14		K L M N
1b	0.55	4	0.14		L M N O
23b	0.57	4	0.14		L M N O
30b	0.61	4	0.14		L M N O
32b	0.69	4	0.14		L M N O
11b	0.76	4	0.14		M N O
25b	0.83	4	0.14		N O
Fertilizada	0.89	4	0.14		O

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
ln(x)	100	0.67	0.57	98.68

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	9.50	24	0.40	6.42	<0.0001
Tratamiento	9.50	24	0.40	6.42	<0.0001
Error	4.63	75	0.06		
Total	14.13	99			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.34985

Error: 0.0617 gl: 75

Tratamiento Medias n E.E.

Control	-0.78	4	0.12	A															
V2	-0.64	4	0.12	A	B														
V30	-0.50	4	0.12	A	B	C													
V1	-0.48	4	0.12	A	B	C	D												
V55	-0.47	4	0.12	A	B	C	D	E											
V32	-0.46	4	0.12	A	B	C	D	E	F										
V14	-0.44	4	0.12	A	B	C	D	E	F	G									
V10	-0.43	4	0.12		B	C	D	E	F	G									
V42	-0.40	4	0.12		B	C	D	E	F	G									
V12	-0.38	4	0.12		B	C	D	E	F	G	H								
V11	-0.37	4	0.12		B	C	D	E	F	G	H								
V29	-0.30	4	0.12		B	C	D	E	F	G	H	I							
V48	-0.26	4	0.12			C	D	E	F	G	H	I							
V39	-0.25	4	0.12			C	D	E	F	G	H	I							
V31	-0.24	4	0.12			C	D	E	F	G	H	I	J						
V53	-0.20	4	0.12			C	D	E	F	G	H	I	J						
V4	-0.18	4	0.12			C	D	E	F	G	H	I	J						
V13	-0.15	4	0.12				D	E	F	G	H	I	J						
V7	-0.12	4	0.12					E	F	G	H	I	J						
V58	-0.11	4	0.12						F	G	H	I	J						
V54	-0.10	4	0.12							G	H	I	J						
D-70	-0.03	4	0.12								H	I	J						
V34	-4.4E-03	4	0.12									I	J						
V33	0.11	4	0.12										J						
Fertilizada	0.89	4	0.12																K

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
ln(x)	28	0.85	0.81	121.42

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7.90	6	1.32	19.69	<0.0001
Tratamiento	7.90	6	1.32	19.69	<0.0001
Error	1.40	21	0.07		
Total	9.30	27			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.38025

Error: 0.0669 gl: 21

Tratamiento Medias n E.E.

Control	-0.78	4	0.13	A
54	-0.72	4	0.13	A B
272	-0.50	4	0.13	A B
270	-0.34	4	0.13	B C
D-70	-0.03	4	0.13	C
271	-0.01	4	0.13	C
Fertilizada	0.89	4	0.13	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
ln(x)	64	0.63	0.52	76.61

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	9.18	15	0.61	5.54	<0.0001
Tratamiento	9.18	15	0.61	5.54	<0.0001
Error	5.31	48	0.11		
Total	14.49	63			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.47276

Error: 0.1106 gl: 48

Tratamiento Medias n E.E.

Control	-0.78	4	0.17	A
D-70	-0.03	4	0.17	B
2b	0.36	4	0.17	B C
31	0.39	4	0.17	B C
19a	0.40	4	0.17	B C
4	0.41	4	0.17	B C
6	0.42	4	0.17	B C D
38	0.44	4	0.17	C D
24b	0.45	4	0.17	C D
1b	0.55	4	0.17	C D
23b	0.57	4	0.17	C D
30b	0.61	4	0.17	C D
32b	0.69	4	0.17	C D
11b	0.76	4	0.17	C D
25b	0.83	4	0.17	C D
Fertilizada	0.89	4	0.17	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

- Determinación de contenido de nitrógeno de parte aérea: transformación  $\sqrt{(x+0.5)}$

Análisis de la varianza					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
raiz(%N+0.5)	165	0.69	0.59	6.18	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1.74	41	0.04	6.67	<0.0001
Tratamiento	1.74	41	0.04	6.67	<0.0001
Error	0.78	123	0.01		
Total	2.52	164			
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.11294					
Error: 0.0064 gl: 123					
Tratamiento	Medias	n	E.E.		
Control	1.00	4	0.04 A		
V48	1.20	3	0.05 B		
54	1.21	4	0.04 B		
V54	1.22	4	0.04 B		
V10	1.22	3	0.05 B		
271	1.22	4	0.04 B		
270	1.22	4	0.04 B		
V33	1.22	4	0.04 B		
272	1.22	4	0.04 B		
V1	1.23	4	0.04 B C		
V53	1.23	4	0.04 B C		
V11	1.23	4	0.04 B C		
V32	1.23	4	0.04 B C		
V13	1.24	4	0.04 B C		
D-70	1.24	4	0.04 B C		
V30	1.24	4	0.04 B C		
V14	1.24	4	0.04 B C D		
V31	1.24	4	0.04 B C D		
V2	1.25	4	0.04 B C D		
V58	1.26	4	0.04 B C D E		
V29	1.26	4	0.04 B C D E		
V4	1.26	4	0.04 B C D E		
V12	1.27	4	0.04 B C D E F		
V42	1.28	4	0.04 B C D E F		
V55	1.28	4	0.04 B C D E F G		
V34	1.28	4	0.04 B C D E F G		
31	1.30	4	0.04 B C D E F G H		
V7	1.30	4	0.04 B C D E F G H		
23b	1.34	4	0.04 C D E F G H I		
V39	1.34	4	0.04 C D E F G H I		
11b	1.35	4	0.04 D E F G H I		
24b	1.35	4	0.04 D E F G H I		
6	1.37	4	0.04 E F G H I		
4	1.37	4	0.04 F G H I		
38	1.38	4	0.04 F G H I		
19a	1.39	4	0.04 G H I		
1b	1.39	4	0.04 G H I		
32b	1.40	3	0.05 G H I		
30b	1.40	4	0.04 H I		
25b	1.40	4	0.04 H I		
2b	1.43	4	0.04 I		
Fertilizada	1.70	4	0.04 J		
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)					

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
raiz(%N+0.5)	98	0.82	0.77	4.58

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1.14	24	0.05	14.25	<0.0001
Tratamiento	1.14	24	0.05	14.25	<0.0001
Error	0.24	73	3.3E-03		
Total	1.38	97			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.08247

Error: 0.0033 gl: 73

Tratamiento Medias n E.E.

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
Control	1.00	4	0.03	A
V48	1.20	3	0.03	B
V54	1.22	4	0.03	B
V10	1.22	3	0.03	B
V33	1.22	4	0.03	B
V1	1.23	4	0.03	B C
V53	1.23	4	0.03	B C
V11	1.23	4	0.03	B C
V32	1.23	4	0.03	B C
V13	1.24	4	0.03	B C
D-70	1.24	4	0.03	B C
V30	1.24	4	0.03	B C
V14	1.24	4	0.03	B C
V31	1.24	4	0.03	B C
V2	1.25	4	0.03	B C
V58	1.26	4	0.03	B C
V29	1.26	4	0.03	B C D
V4	1.26	4	0.03	B C D
V12	1.27	4	0.03	B C D
V42	1.28	4	0.03	B C D
V55	1.28	4	0.03	B C D
V34	1.28	4	0.03	B C D
V7	1.30	4	0.03	C D
V39	1.34	4	0.03	D
Fertilizada	1.70	4	0.03	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)



Análisis de la varianza					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
raiz(%N+0.5)	28	0.90	0.87	6.03	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1.08	6	0.18	31.23	<0.0001
Tratamiento	1.08	6	0.18	31.23	<0.0001
Error	0.12	21	0.01		
Total	1.20	27			
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.11168					
Error: 0.0058 gl: 21					
Tratamiento	Medias	n	E.E.		
Control	1.00	4	0.04	A	
54	1.21	4	0.04	B	
271	1.22	4	0.04	B	
270	1.22	4	0.04	B	
272	1.22	4	0.04	B	
D-70	1.24	4	0.04	B	
Fertilizada	1.70	4	0.04	C	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)					

Análisis de la varianza					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
raiz(%N+0.5)	63	0.70	0.60	7.39	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1.11	15	0.07	7.28	<0.0001
Tratamiento	1.11	15	0.07	7.28	<0.0001
Error	0.48	47	0.01		
Total	1.59	62			
Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.14478					
Error: 0.0101 gl: 47					
Tratamiento	Medias	n	E.E.		
Control	1.00	4	0.05	A	
D-70	1.24	4	0.05	B	
31	1.30	4	0.05	B C	
23b	1.34	4	0.05	B C	
11b	1.35	4	0.05	B C	
24b	1.35	4	0.05	B C	
6	1.37	4	0.05	B C	
4	1.37	4	0.05	B C	
38	1.38	4	0.05	B C	
19a	1.39	4	0.05	C	
1b	1.39	4	0.05	C	
32b	1.40	3	0.06	C	
30b	1.40	4	0.05	C	
25b	1.40	4	0.05	C	
2b	1.43	4	0.05	C	
Fertilizada	1.70	4	0.05	D	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)					