

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA



Proyecto de Trabajo Final presentado para optar al Grado de
Ingeniero Agrónomo

**Solubilización de fosfatos por *Pseudomonas fluorescens* CHA0
y ensayo de coinoculación con *Sinorhizobium meliloti* 3DOh13
en alfalfa**

**Estudiante: MARCELO GIMÉNEZ
DNI: 29838998**

Director: Dr. Javier Alberto ANDRÉS

Río Cuarto – Córdoba
2013

FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final: SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS POR *Pseudomonas fluorescens* CHA0 Y ENSAYO DE COINOCULACIÓN CON *Sinorhizobium meliloti* 3DOH13 EN ALFALFA

Autor: Giménez, Marcelo Javier. DNI: 29.838.998

Director: Dr. Javier Alberto Andrés.

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias del Jurado Evaluador:

Amuschástegui, María _____

Bruno, Carla _____

Fecha de Presentación: ____/____/____.

Aprobado por Secretaría Académica: ____/____/____.

Secretario Académico

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional de Río Cuarto por haber contribuido a mi formación profesional y humana.
- A mi Director de Tesis, Dr. Javier Alberto Andrés por su tiempo y dedicación.
- Al jurado titular (María Amuschástegui y Carla Bruno) y a la Lic. Alicia María Thuar, por su valiosa opinión y aportes que permitieron enriquecer éste trabajo.
- A mi familia por confiar en mí, darme la oportunidad de poder estudiar esta carrera, enseñarme a crecer como persona y estar siempre que los necesité.
- A mis amigos y compañeros de estudio por darme fuerzas, alegría, ayuda y por todos los momentos compartidos durante mi estadía en la Universidad.
- A todas las personas que aportaron su granito de arena para que pueda llegar a este momento, sin las mismas no lo hubiese logrado.

Dedico este trabajo final de Ingeniería especialmente a mi hijo y esposa, que hicieron posible gracias a su apoyo incondicional, confianza y esfuerzo, poder lograr con perseverancia y esfuerzo mis objetivos personales y profesionales.

ÍNDICE GENERAL

	<u>Página</u>
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
1.1. Hipótesis	5
1.2. Objetivos	5
2. MATERIALES Y MÉTODOS	6
2.1. Ensayos de solubilización de distintas fuentes de P en medios alternativos.	6
2.1.1. Medio inicialmente descrito por Frioni (1992) y modificado por Rosas <i>et al.</i> , (2006) con variaciones en la fuente de P.	6
2.1.2. Medio Pikovskaya (PVK), original y variando la fuente de P.	6
2.1.3. Medio NBRIP, original y variando la fuente de P.	7
2.2. Ensayos de coexistencia entre las cepas bacterianas <i>Sinorhizobium meliloti</i> 3DOh13 y <i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0.	7
2.3.-Ensayos de inoculación y/o coinoculación de alfalfa en condiciones de invernáculo.	7
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
3.1. Ensayos de solubilización de distintas fuentes de P en medios alternativos.	9
3.2. Ensayos de coexistencia entre las cepas bacterianas <i>Sinorhizobium meliloti</i> 3DOh13 y <i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0.	13
3.3. Ensayos de inoculación y/o coinoculación de alfalfa en condiciones de invernáculo.	17
4. CONCLUSIONES.	20
5. BIBLIOGRAFÍA.	21
6. ANEXO.	26

ÍNDICE DE TABLAS

	<u>Página</u>
Tabla 1.- Medio inicialmente descrito por Frioni (1992) y modificado por Rosas <i>et al.</i> , (2006) con variaciones en la fuente de fósforo.	9
Tabla 2.- Medio Pikovskaya (PVK), original y variando la fuente de fósforo.	10
Tabla 3.- Medio NBRIP, original y variando la fuente de fósforo.	11
Tabla 4.- Parámetros de la parte radical de plántulas de alfalfa inoculadas con <i>P. fluorescens</i> CHAO y <i>S. meliloti</i> 3DOh13. Datos a 50 días de cultivo.	17
Tabla 5.- Parámetros de la parte aérea de plántulas de alfalfa inoculadas con <i>P. fluorescens</i> CHAO y <i>S. meliloti</i> 3DOh13. Datos a 50 días de cultivo.	19

ÍNDICE DE FOTOS

	<u>Página</u>
Foto 1.- Ensayo de coexistencia en medio YEMA (Vincent, 1970), entre las cepas bacterianas <i>Sinorhizobium meliloti</i> 3DOh13 y <i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0, en siembra simultánea.	13
Foto 2.- Ensayo de coexistencia en medio YEMA (Vincent, 1970), entre las cepas bacterianas <i>Sinorhizobium meliloti</i> 3DOh13 y <i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0, en siembra espaciada.	14
Foto 3.- Ensayo de coexistencia en medio TSA diluído al 25% (Agar Tripticasa Soya – Laboratorio Britania, Argentina) entre las cepas bacterianas <i>Sinorhizobium meliloti</i> 3DOh13 y <i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0, en siembra simultanea.	15
Foto 4.- Ensayo de coexistencia en medio TSA diluído al 25% (Agar Tripticasa Soya – Laboratorio Britania, Argentina) entre las cepas bacterianas <i>Sinorhizobium meliloti</i> 3DOh13 y <i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0, en siembra espaciada.	16

RESUMEN

El fósforo (P) es el macronutriente limitante del crecimiento vegetal más importante en el suelo luego del nitrógeno ya que cumple un papel significativo en varios procesos fisiológicos y bioquímicos de la planta. La mayoría de los suelos agrícolas contienen grandes reservas de P total, pero sólo una pequeña proporción de P está inmediatamente disponible en la solución como aniones de ortofosfato para ser tomado por los vegetales. Para poder satisfacer los requerimientos de la planta debe darse respuesta a partir de otras fuentes de P. En este contexto, los microorganismos juegan un papel fundamental mediando en la movilización del P para las plantas.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la capacidad de solubilizar fosfatos desde diversas fuentes por las cepas *Sinorhizobium meliloti* 3DOh13, *Pseudomonas fluorescens* CHA0 y SP22 y evaluarlos en ensayos de inoculación simple y mixta en alfalfa.

En ningún caso las cepas *S. meliloti* 3DOh13, *P. fluorescens* CHA0 y SP22 formaron halo en los medios donde el fósforo estaba ligado a Fe y Al y el crecimiento de éstas en estos medios fue inferior al observado en los medios donde el fósforo estaba ligado a Ca, sin embargo la solubilización, aunque escasa, se estuvo llevando a cabo.

Las tres cepas utilizadas, crecieron en todos los medios de cultivo, si bien lo hacen mejor en los medios suplementados con calcio.

La coinoculación no mejoró los parámetros de crecimiento respecto de las inoculaciones simples, sin embargo la misma podría ser de importancia cuando se busque proteger al sistema con el efecto biocontrolador de CHAO.

ABSTRACT

Phosphorus (P) is the limiting macronutrient most important plant growth in soil and nitrogen after which plays a significant role in several physiological and biochemical processes of the plant. Most agricultural soils contain large reserves of total P, but only a small proportion of P is immediately available in the solution as orthophosphate anions to be taken by plants. In order to meet the requirements of the plant must be answered from other sources of P. In this context, microorganisms play a major role in mediating the mobilization of P for plants.

The aim of this work was to study the ability to solubilize phosphate from different sources by strains 3DOh13 *Sinorhizobium meliloti*, *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and SP22 and evaluate trials of simple and mixed inoculation in alfalfa.

In any case the strains S. 3DOh13 meliloti, P. fluorescens CHA0 and SP22 halo formed in media where phosphorus was bound to Fe and Al and their growth in the media was less than observed in the media where the phosphor was linked to Ca, however solubilization, though sparse, is was carried out.

The three strains used grew in all culture media, although they do better in media supplemented with calcium.

Co-inoculation did not improve growth parameters on single inoculations, however the same could be important when seeking to protect the system with CHA0 biocontrol effect.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El fósforo (P) es el macronutriente limitante del crecimiento vegetal más importante en el suelo luego del nitrógeno ya que cumple un papel significativo en varios procesos fisiológicos y bioquímicos de la planta, tales como fotosíntesis, transformación de azúcares en almidón y almacenamiento/transporte de la información genética. La mayoría de los suelos agrícolas contienen grandes reservas de P total, comúnmente en el rango de 200 a 5000 mg P.kg⁻¹, debido a la aplicación regular de fertilizantes químicos o de los procedentes del tratamiento de aguas residuales (Ravindra *et al.*, 2008). En los suelos ocurren tanto la precipitación como la fijación del P debido a la gran reactividad de los iones fosfatos con diversos constituyentes del suelo, fundamentalmente con calcio (Ca), hierro (Fe) y aluminio (Al). De esta manera, sólo una pequeña proporción de P está inmediatamente disponible para ser tomado por los vegetales (Gyaneshwar *et al.*, 2002; De-Bashan y Bashan, 2004). Las plantas obtienen el P como aniones de ortofosfato, predominantemente en las formas de HPO₄⁻² y HPO₄⁻¹ desde la solución del suelo. En la mayoría de los suelos, la concentración de ortofosfatos en solución es baja y debe darse respuesta a partir de otras fuentes de P para poder satisfacer los requerimientos de la planta (Richardson *et al.*, 2009). En este contexto, los microorganismos juegan un papel fundamental mediando en la movilización del P para las plantas. La movilización es una expresión que incluye dos modos diferentes de acción microbiana: la solubilización desde fuentes inorgánicas y la mineralización desde fuentes orgánicas. El proceso inverso, denominado inmovilización del P, se refiere a la incorporación del fosfato inorgánico desde la solución del suelo a moléculas orgánicas a través de reacciones metabólicas o a partículas del suelo por adsorción o precipitación (Richardson y Simpson, 2011). De esta manera, los microorganismos que movilizan fosfatos son aceptados como una clase de microorganismos promotores del crecimiento vegetal, internacionalmente reconocidos por la sigla PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria) desde la cita de Kloepper y Schroth, 1978. Estos microorganismos son empleados como biofertilizantes a fin de promover el crecimiento y sanidad de los cultivos minimizando el uso de productos químicos (Lugtenberg y Kamilova, 2009). Las principales cepas bacterianas que presentan la capacidad solubilizadora se ubican en los géneros *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Achromobacter*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* (Rodríguez y Fraga, 1999; Fernández *et al.*, 2007).

Entre ellos, los aislamientos del género *Pseudomonas* son de gran interés, debido a que usualmente presentan más de una característica promotora del crecimiento vegetal, como antagonismo hacia hongos fitopatógenos y resistencia sistémica inducida (Haas y Dèfago, 2005), biodegradación de poluentes y de inhibidores del crecimiento vegetal (Ramette *et al.*, 2011), la alta capacidad de colonización de la rizosfera (Browne *et al.*, 2009) y la factibilidad de empleo como biofertilizantes en campos agrícolas (De Souza *et al.*, 2003).

Las *Pseudomonas* fluorescentes son rizobacterias no patógenas (Saravanan *et al.*, 2004) y varios aislamientos de *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas aureofaciens* suprimieron el crecimiento de microorganismos fitopatógenos a través de diversos mecanismos que incluyen la colonización rizosférica, la antibiosis, la quelación de hierro por producción de sideróforos y la resistencia sistémica inducida (Ramamoorthy *et al.* 2002; Karthikeyan *et al.*, 2006). La cepa de *Pseudomonas fluorescens* CHA0 efectivamente protege al cultivo de trigo ante una variedad de enfermedades, detectándose en ella la producción de varios metabolitos secundarios con propiedades antibióticas como el 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), la pioluteorina (Plt) y el cianuro de hidrógeno (Défago *et al.*, 1990). Otros estudios mostraron la capacidad de esta cepas para producir fitohormonas (Ardebili *et al.*, 2011) y solubilizar fosfatos (Ghaderi *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2012).

La disponibilidad de P constituye uno de los principales limitantes para la FBN, afectando principalmente la formación de los nódulos. La respuesta positiva a la disponibilidad de P ha sido reportada en leguminosas tales como alfalfa, trébol, poroto, maní, garbanzo y gandul (Cassman *et al.*, 1981; Al-Niemi *et al.*, 1997; Gyaneshwar *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2007, Wani *et al.*, 2007).

Varios aspectos del proceso de formación de los nódulos se ven limitados por la disponibilidad de P (Schulze *et al.*, 2006; Kouas *et al.*, 2005). Los nódulos de plantas que crecen con suficiente P presentan una concentración de este mineral superior a la que se puede encontrar en tallos y raíces, y en algunos casos esta cantidad llegó a representar el 1.5% del P total de la planta (Schulze *et al.*, 2006). Por su parte, plantas que crecieron en ambientes deficientes en P exhibieron un reducido suministro de carbohidratos a los nódulos lo que afectó la iniciación de la nodulación, el crecimiento de los nódulos ya formados y disminución marcada de la actividad nitrogenasa (Remans *et al.*, 2007). Otro estudio mostró que los bacteroides pudieron verse limitados en su

requerimiento de P aún cuando la planta no evidenció este déficit (Al-Niemi *et al.*, 1997)

Sólo unos pocos investigadores informan sobre la capacidad de cepas de rizobios para solubilizar fosfatos (Chabot *et al.*, 1993 y 1996, Halder *et al.*, 1991 y 1992, Ahmad *et al.*, 2008).

Existen numerosas publicaciones referidas al efecto positivo de la inoculación combinada de rizobios con bacterias de vida libre de los géneros *Pseudomonas* (Knighth y Langson-Unkefer, 1988; Rosas *et al.*, 2006) y *Bacillus* (Sindhu *et al.*, 2002) sobre distintas leguminosas. Estos efectos abarcan inicio más temprano de la nodulación, incremento en el número de nódulos, incrementos en la tasa respiratoria de raíces y en la actividad nitrogenasa, mejor toma de agua y nutrientes y un mejor estado general de la planta. La coinoculación con *Azospirillum* y bacterias solubilizadoras de fosfatos incrementó el crecimiento, rendimiento y toma de nitrógeno, fósforo y otros minerales en sorgo y cebada (Bashan y Holguín, 1997).

Las bacterias solubilizadoras de fosfatos son rutinariamente aislados por métodos de cultivos en placa con medios con fuente de P insoluble como el empleado por Rosas *et al.* 2006 y el muy difundido medio descrito por Pikovskaya en 1948 (conocido como medio PVK). Estas pruebas, de relativa eficiencia, se llevan a cabo mediante la selección de los microorganismos que son capaces de producir un halo o zona clara alrededor de la colonia debido a la producción de ácidos orgánicos en el medio circundante.

Sin embargo, la fiabilidad de esta técnica se puso en duda dado que numerosos aislamientos, que no produjeron ningún halo visible, solubiliaron fosfatos inorgánicos en medio líquido. Una modificación sugerida en estos medios a fin de mejorar la claridad y visibilidad de los halos es la utilización del colorante azul de bromofenol suplementando al medio (Gupta *et al.*, 1994).

Una crítica que se le suele formular a los medios tradicionales es la presencia de extracto de levadura en su composición ya que siempre es deseable trabajar con medios definidos, en los que conocemos exactamente su composición, cuando se procura dilucidar el papel de los microorganismos en la mineralización o solubilización de nutrientes.

Por lo tanto, un nuevo medio definido, denominado NBRIP (sigla del Instituto Nacional de Investigación en Botánica de la India) fue propuesto como alternativa al PVK para la detección de microorganismos solubilizadores de fosfatos (Nautiyal, 1999).

Alfalfa (*Medicago sativa L.*) es la leguminosa forrajera más importante que se cultiva en el país por la calidad de nutrientes que provee. Se estima que en Argentina se cultivan 6 millones de hectáreas de alfalfa, ubicando a nuestro país como segundo productor mundial, luego de los EE.UU (www.procisur.org.uy). Este cultivo ha sido tradicionalmente la base de la producción forrajera y, junto al trigo, uno de los iniciadores de la agricultura pampeana. La gran difusión de su cultivo se debe también a su adaptabilidad a diferentes suelos y climas y al importante rol que juega en sostener la estructura y fertilidad de los suelos, especialmente cuando puede desarrollar la simbiosis fijadora de N₂ con cepas de rizobios (Muslera Pardo *et al.*, 1984; Viglizzo, 1995; Guiñazú, 2009).

La mayor superficie cultivada corresponde a la región pampeana subhúmeda y semiárida (provincias de Córdoba, Santa Fe, Buenos Aires y La Pampa) en donde las principales limitantes para la FBN son la disponibilidad de agua, acidez del suelo y bajo niveles de fósforo soluble (Hijano y Basigalup, 1995). La agricultura continua durante más de 20 años causó un considerable decrecimiento en el P soluble y, en menor medida, en el P inorgánico total (Urioste *et al.*, 1996)

En el área núcleo de Argentina, en condiciones de secano, la alfalfa puede producir entre 8 y 22 Ton. Ha⁻¹ año⁻¹ de materia seca, dependiendo de la disponibilidad hídrica del año (Hijano & Basigalup, 1995). Esto implica para contenidos medios de proteína del 20%, un consumo cercano a los 500 kg.ha⁻¹.año⁻¹ de nitrógeno, posibles de ser exportados del área de producción, cuando se utiliza como forraje de corte. Bajo condiciones de riego, con rendimientos que pueden superar las 28 Ton, las extracciones de nitrógeno se pueden aproximar a los 800 Kg ha⁻¹ año⁻¹ (Collino *et al.*, 1997; Racca *et al.*, 1998).

La utilización para la siembra de semillas preinoculadas con rizobios de origen extranjero, cuya eficiencia y adaptación a las condiciones locales no siempre se conocen (Dubois, 1999), y con escasa capacidad de competencia ante las cepas naturalizadas, trae como consecuencia un bajo establecimiento de la nodulación y por consiguiente una escasa reposición del nitrógeno removido del suelo. Aún cuando la inoculación está relativamente difundida, en la actualidad no se ha determinado la proporción relativa de la FBN que proveen las cepas introducidas respecto de las nativas o naturalizadas, ni la competencia que se genera en el suelo, entre ellas, por la ocupación de los sitios potenciales para la formación de nódulos.

Por lo tanto, el desarrollo de productos biotecnológicos que involucren microorganismos rizosféricos reviste un gran interés a efecto de optimizar la FBN e incrementar la toma de agua y nutrientes en los cultivos.

1.1.- HIPÓTESIS

- La detección a nivel de laboratorio de la solubilización microbiana de fosfatos a partir de una misma fuente insoluble se encuentra influenciada por la composición del medio de cultivo
- La inoculación de alfalfa con microorganismos solubilizadores de fosfatos tiene un efecto promotor de la fijación biológica del nitrógeno y del crecimiento vegetal en condiciones de baja disponibilidad de fósforo

1.2.- OBJETIVOS

○ *Objetivos generales:*

- Estudiar la capacidad de solubilizar fosfatos desde diversas fuentes por microorganismos nativos y cepas de colección y evaluarlos en ensayos de inoculación simple y mixta en alfalfa.

○ *Objetivos específicos:*

- Caracterizar las cepas *Sinorhizobium meliloti* 3DOh13, *Pseudomonas fluorescens* CHA0 y otras especies bacterianas en cuanto a su capacidad de solubilizar fosfatos de Ca, Fe y Al en diferentes medios de cultivo.
- Evaluar las cepas bacterianas *Sinorhizobium meliloti* 3DOh13 y *Pseudomonas fluorescens* CHA0 en inoculación simple y mixta sobre el cultivo de alfalfa

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.-Ensayos de solubilización de distintas fuentes de P en medios alternativos:

Para los ensayos de solubilización, los microorganismos a ensayar se sembraron en cajas de Petri que contenían los diferentes medios a evaluar, presentando fuentes de fósforo insoluble, bajo las formas de fosfatos de Ca, Al y Fe.

Cada una de las cepas, aisladas y mantenidas en medio TSA 25%, fueron sembradas por picadura en los siguientes medios de cultivo:

2.1.1- Etapa 1. Medio inicialmente descrito por Frioni (1992) y modificado por Rosas *et al.*, (2006) con variaciones en la fuente de P

Glucosa	20 g
Extracto de levadura	2 g
P-tricálcico	2 g
Agar	15 g
Agua hasta	1 l

Medios alternativos: se reemplazó el P-tricálcico por igual cantidad de P-Al y P-Fe.

En estos medios se agregó CaCl_2 1 g para reemplazar la fuente de calcio

2.1.2- Etapa 2. Medio Pikovskaya (PVK), original y variando la fuente de P

Glucosa	10 g
P-tricálcico	5 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5 g
NaCl	0.2 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1 g
KCl	0.2 g
Extracto de levadura	0.5 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.002 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.002 g
Agar	15 g
Agua hasta	1 l

(Opción: se agregó en una repetición de la experiencia Azul de bromofenol 0.025 g/l)

Medios alternativos: se reemplazó el P-tricálcico por igual cantidad de P-Al y P-Fe.

En estos medios se agregó CaCl_2 1 g para reemplazar la fuente de calcio

2.1.3- Etapa 3. Medio NBRIP, original y variando la fuente de P

Glucosa	10 g
P-tricálcico	5 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25 g
KCl	0.2 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.1 g
Agar	15 g
Agua hasta	1 l

(Opción: se agregó en una repetición de la experiencia Azul de bromofenol 0.025 g/l)

Medios alternativos: se reemplazó el P-tricálcico por igual cantidad de P-Al y P-Fe.

En estos medios se agregó CaCl_2 1 g para reemplazar la fuente de calcio

Se incubó a 28 °C y diariamente se observó la evolución del crecimiento, midiendo en mm el radio del halo que se iban formando en torno a la colonia.

2.2-Ensayos de coexistencia entre las cepas bacterianas *Sinorhizobium meliloti* 3DOh13 y *Pseudomonas fluorescens* CHA0:

Se realizó en los medios de cultivo YEMA (Vincent, 1970) y TSA diluido al 25% (Agar Tripticasa Soya – Laboratorio Britania, Argentina). Las cepas se sembraron por estriado hasta el centro de la caja de Petri, cada una cubriendo una mitad de la superficie del medio de cultivo. Se realizaron siembras simultáneas y espaciadas, en este último caso, la segunda cepa se sembró una vez que se observó el crecimiento de la primera. Los medios sembrados se incubaron a 28°C durante un lapso de más de 48h, debido a la velocidad de crecimiento de las cepas.

2.3.-Ensayos de inoculación y/o coinoculación de alfalfa en condiciones de invernáculo:

Las semillas de alfalfa fueron desinfectadas por agitación durante 10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 30% (dilución en base a la formulación comercial 55 g/l). Para los ensayos de inoculación, fueron sembradas bajo condiciones asépticas en bolsas de polietileno negro de 14 cm de alto por 10 cm de ancho, conteniendo cada una 1kg del soporte perlita/arena (2:1). Las plantas fueron inoculadas 2 días luego de la emergencia. La inoculación se realizó aplicando en el sitio de siembra 2 mililitros del

cultivo bacteriano (en fase exponencial tardía – comienzo de fase estacionaria) sobre el sistema radical de cada plántula. Las plantas fueron regadas alternativamente con agua destilada y solución de Jensen libre de N (Vincent 1970) modificada en su fuente de P (originalmente el P proviene de CaHPO_4 y K_2HPO_4 y es reemplazado por $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Los controles no inoculados fueron regados de la misma manera pero con la adición de 0.5% KNO_3 por litro de solución de Jensen como fuente de nitrógeno y manteniendo su fuente original de P soluble.

El ensayo incluyó los siguientes tratamientos:

- a- Inoculación simple con la cepa *Sinorhizobium meliloti* 3DOh13 (Rosas *et al.*, 2006)
- b- Inoculación simple con la cepa bacteriana *Pseudomonas fluorescens* CHA0 (Défago *et al.*, 1990)
- c- Inoculación mixta *Sinorhizobium meliloti* 3DOh13 y *Pseudomonas fluorescens* CHA0
- d- Control no inoculado y suplementado con N (0.005 g/l de KNO_3 a la solución de Jensen)
- e- Control no inoculado y sin N

La experiencia se llevó a cabo en invernáculo y alternativamente en cámaras bajo condiciones controladas de luz y temperatura (Ciclo de 16 h de luz a 28 ± 2 °C y 8 h de oscuridad a 16 ± 2 °C y bajo una intensidad lumínica de $220 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$). Aproximadamente 50 días luego de la siembra se evaluó: longitud de tallos y raíces, peso seco de parte aérea y radical, número de nódulos, superficie radical (Técnica de Carley y Watson, 1966) y estado general de la planta.

Cada tratamiento se realizó por triplicado y cada maceta contenía 4 plantas. Los resultados fueron analizados estadísticamente por análisis de la varianza (ANOVA) y la comparación de medias se realizó mediante el test de Duncan ($\alpha < 0.05$). Estas evaluaciones fueron realizadas por medio del Software Estadístico InfoStat (InfoStat, 2004).

3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.- Ensayos de solubilización de distintas fuentes de P en medios alternativos

Para los ensayos de solubilización de distintas fuentes de P en medios alternativos, los resultados obtenidos se muestran en las tablas 1, 2 y 3 respectivamente.

Tabla 1.- Medio inicialmente descrito por Frioni (1992) y modificado por Rosas *et al.*, (2006) con variaciones en la fuente de fósforo.

TIEMPO DE CRECIMIENTO	CEPA	MEDIO					
		FRIONI-Ca		FRIONI-Fe		FRIONI-Al	
		Ø colonia (mm)	halo(mm)	Ø colonia (mm)	halo(mm)	Ø colonia (mm)	halo(mm)
24h	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 3DOh13	3,0 ± 0,5	-	0,5 ± 0,1	-	0,5 ± 0,1	-
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0	13,0 ± 4,2	3,0 ± 1,4	0,5 ± 0,1	-	0,5 ± 0,1	-
	SP22 control	12,6 ± 2,8	5,2 ± 2,5	0,5 ± 0,1	-	0,5 ± 0,1	-
72h	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 3DOh13	3,5 ± 0,5	-	3,2 ± 1,8	-	3,6 ± 1,5	-
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0	12,0 ± 5,7	2,5 ± 1,9	1,0 ± 0,1	-	5,0 ± 0,1	-
	SP22 control	15,0 ± 3,3	4,8 ± 1,9	2,4 ± 0,8	-	2,2 ± 0,2	-
120h	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 3DOh13	4,0 ± 0,5	-	3,6 ± 0,5	-	5,7 ± 1,2	-
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0	17,7 ± 5,5	4,0 ± 0,8	1,5 ± 0,1	-	4,3 ± 1,5	-
	SP22 control	31,3 ± 1,0	9,1 ± 2,0	2,5 ± 0,5	-	3,2 ± 1,7	-

En la **tabla 1** podemos observar, que las cepas *Pseudomonas fluorescens* CHA0 y la cepa control SP22, tienen mejor crecimiento en los medios donde el fósforo se encuentra como P-tricálcico. Además producen halo en el medio, lo que evidencia su capacidad de solubilizar fósforo.

La cepa *Sinorhizobium meliloti* 3DOh13, puede crecer en los tres medios utilizados, pero tiene mayor crecimiento en los medios donde el fósforo se encuentra como P-tricálcico.

Ninguna de las cepas ensayadas, evidencio halo en los medio con Fe y Al, sin embargo se observó crecimiento en los mismos, por lo que la solubilización, aunque escasa, se estaría llevando a cabo.

Tabla 2.- Medio Pikovskaya (PVK), original y variando la fuente de fósforo.

TIEMPO DE CRECIMIENTO	CEPA	MEDIO					
		PVK-Ca		PVK-Fe		PVK-Al	
		Ø colonia (mm)	halo(mm)	Ø colonia (mm)	halo(mm)	Ø colonia (mm)	halo(mm)
24h	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 3DOh13	3,3 ± 0,6	-	1,6 ± 0,6	-	2,3 ± 2,3	-
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0	7,3 ± 1,5	1,3 ± 0,6	3,6 ± 1,5	-	1,0 ± 0,0	-
	SP22 control	9,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	5,5 ± 0,7	-	-	-
72h	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 3DOh13	3,3 ± 0,6	-	2,6 ± 0,6	-	4,3 ± 0,6	-
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0	7,6 ± 1,5	1,3 ± 0,6	4,6 ± 0,6	-	3,0 ± 1,0	-
	SP22 control	10,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0	6,5 ± 2,1	-	0,5 ± 0,0	-
120h	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 3DOh13	3,6 ± 0,6	-	2,6 ± 0,6	-	4,3 ± 0,6	-
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0	13,3 ± 3,5	4,0 ± 1,7	5,0 ± 0,0	-	3,3 ± 0,6	-
	SP22 control	17,0 ± 1,4	6,5 ± 0,7	6,5 ± 2,1	-	0,5 ± 0,0	-

Podemos observar en la **tabla 2**, que las cepas *Pseudomonas fluorescens* CHA0 y la cepa SP22, tienen mejor crecimiento en el medio cuya fuente de fósforo es P-tricálcico, coincidiendo con lo observado en el medio Frioni. En ambas también podemos observar la presencia de un halo en este medio, que nos indica que solubilizan el fósforo en estas condiciones de cultivo.

La cepa *Sinorhizobium meliloti* 3DOh13, es la que manifiesta mejor crecimiento en el medio donde el fósforo se encuentra ligado a aluminio. Aunque esta cepa no presenta halo en ningún medio PVK alternativo, no podemos decir que no tiene capacidad de solubilizar el fósforo.

Tabla 3.- Medio NBRIP, original y variando la fuente de fósforo.

TIEMPO DE CRECIMIENTO	CEPA	MEDIO					
		NBRIP-Ca		NBRIP-Fe		NBRIP-Al	
		Ø colonia (mm)	halo(mm)	Ø colonia (mm)	halo(mm)	Ø colonia (mm)	halo(mm)
24h	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 3DOh13	4,5 ± 0,7	-	1,0 ± 0,0	-	1,0 ± 0,0	-
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0	8,0 ± 1,4	1,5 ± 0,0	2,0 ± 0,0	-	2,7 ± 1,0	-
	SP22 control	10,0 ± 2,8	2,2 ± 0,3	5,0 ± 2,8	-	1,0 ± 0,0	-
72h	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 3DOh13	4,5 ± 0,7	-	1,2 ± 0,3	-	1,0 ± 0,0	-
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0	8,0 ± 1,4	1,5 ± 0,0	2,0 ± 0,0	-	3,5 ± 0,7	-
	SP22 control	11,0 ± 1,4	3,0 ± 1,4	5,5 ± 2,1	-	1,0 ± 0,0	-
120h	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 3DOh13	6,5 ± 0,7	1,0 ± 0,0	1,2 ± 0,3	-	1,0 ± 0,0	-
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0	10,5 ± 2,1	2,2 ± 0,3	2,5 ± 0,0	-	3,5 ± 0,7	-
	SP22 control	13,7 ± 0,3	3,7 ± 0,3	5,5 ± 2,1	-	1,0 ± 0,0	-

En estas condiciones de cultivo, las dos cepas en estudio (*Pseudomonas fluorescens* CHAO y *Sinorhizobium meliloti* 3DOh13) y la cepa SP22, tienen mejor crecimiento en el medio donde el fósforo se encuentra como P-tricálcico.

Las cepas *Pseudomonas fluorescens* CHAO y SP22 presentan halo, lo que indica su capacidad de solubilizar el fósforo en estas condiciones.

La cepa *Sinorhizobium meliloti* 3DOh13, no produce halo, sin embargo no podemos decir que la misma no tiene capacidad de solubilizar fósforo en estas condiciones de cultivo.

Las cepas *Sinorhizobium meliloti* 3DOh13 manifiestan crecimiento en todos los medios de cultivo, pero presentó mejor desarrollo en el medio Frioni-calcio. Aunque crece en todos los medios, este es mejor en los medios de cultivo suplementados con calcio.

Las cepas *Pseudomonas fluorescens* CHAO crecen en todos los medios de cultivo, pero manifiesta mejor desarrollo en el medio Frioni-calcio. Se desarrolla mejor en los medios suplementados con calcio.

Las cepas *SP22* control es capaz de crecer en todos los medios de cultivo, pero manifiesta mejor crecimiento en el medio Frioni-calcio, aunque crecen en todos los medios suplementados con calcio.

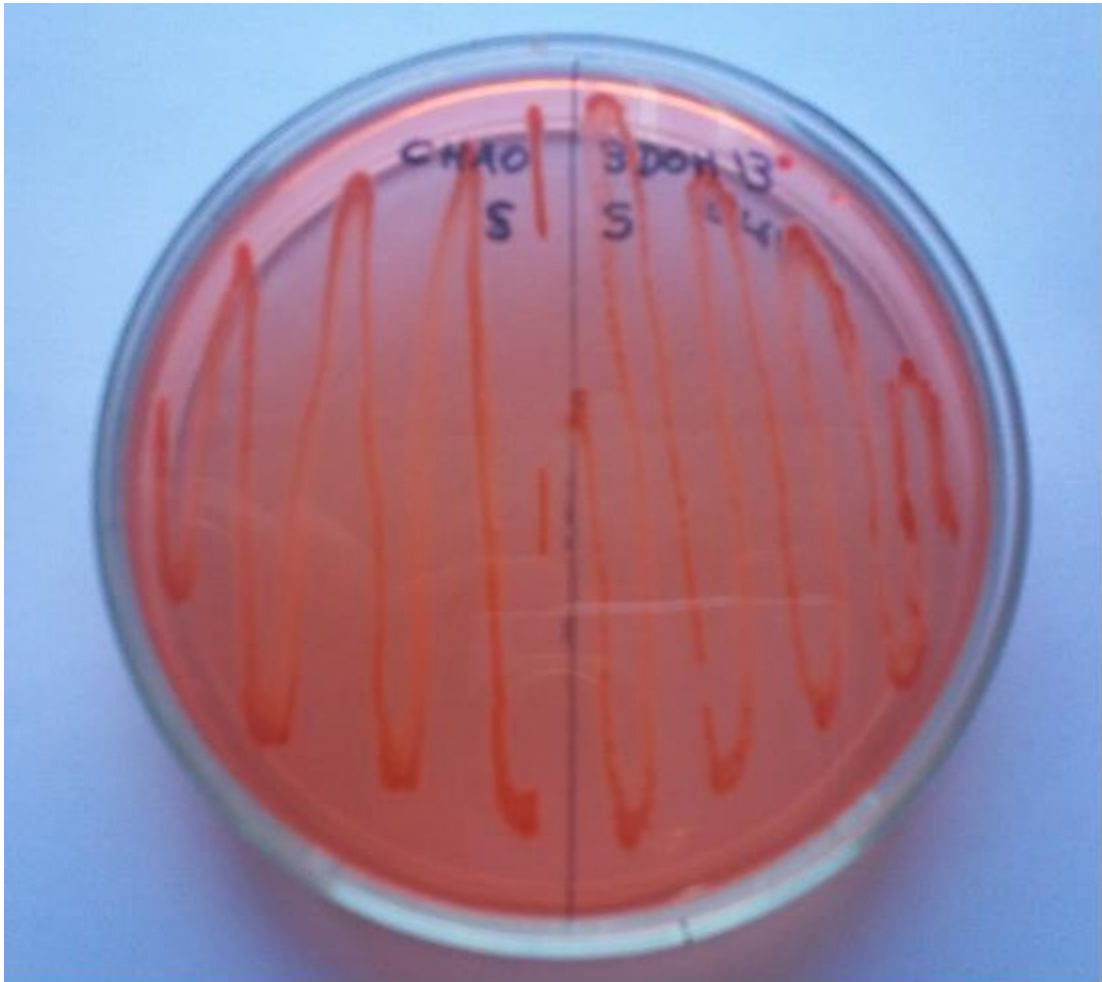
Como se puede observar las tres cepas utilizadas, crecen en todos los medios de cultivo, si bien lo hacen mejor en los medios suplementados con calcio.

En las condiciones de nuestro estudio, los resultados obtenidos en los medios tradicionalmente usados para la detección de la solubilización de fosfatos pudieron ser reproducidos en el medio NBRIP, tal como lo propuso por Nautiyal (1999).

Por otra parte, el empleo del colorante azul de bromofenol en los medios, sugerido por Gupta *et al.* (2004) permitió una mejor visualización del resultado cuando los halos estuvieron presentes.

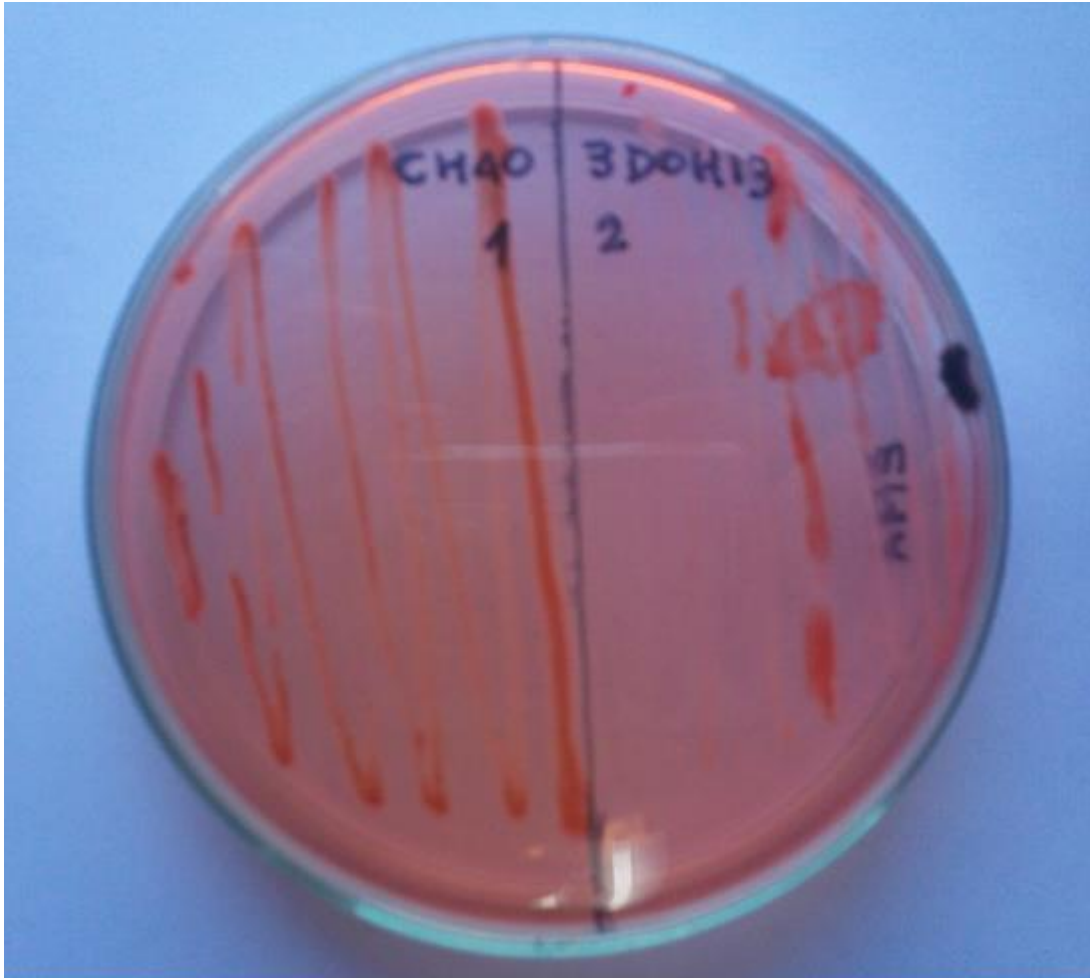
3.2.- Ensayos de coexistencia entre las cepas bacterianas *Sinorhizobium meliloti* 3DOh13 y *Pseudomonas fluorescens* CHA0

Foto 1.- Ensayo de coexistencia en medio YEMA (Vincent, 1970), entre las cepas bacterianas *Sinorhizobium meliloti* 3DOh13 y *Pseudomonas fluorescens* CHA0, en siembra simultánea.



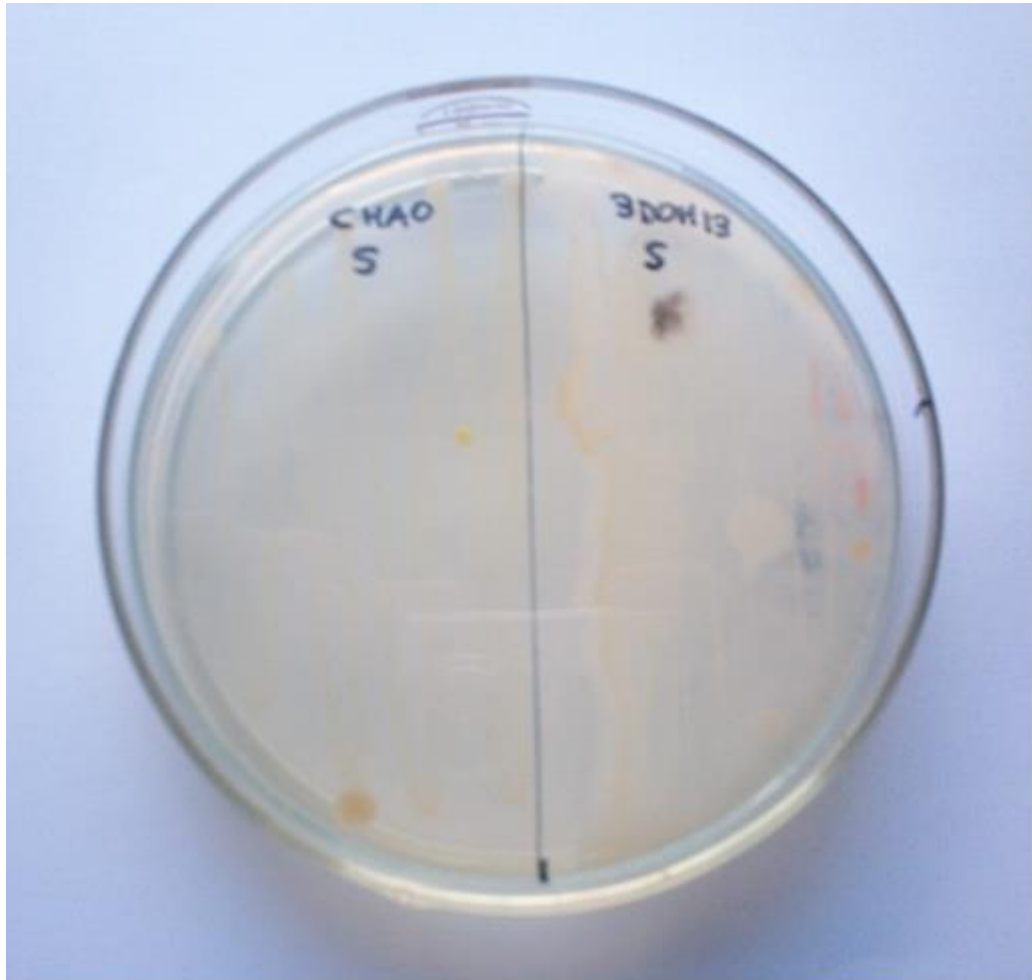
En esta foto se puede observar el crecimiento de ambas cepas (*P. fluorescens* CHA0 y *S. meliloti* 3DOh13) en siembra realizada en simultáneo en medio YEMA, por lo que podemos decir que las cepas pueden coexistir en el mismo medio.

Foto 2.- Ensayo de coexistencia en medio YEMA (Vincent, 1970), entre las cepas bacterianas *Sinorhizobium meliloti* 3DOh13 y *Pseudomonas fluorescens* CHAO, en siembra espaciada.



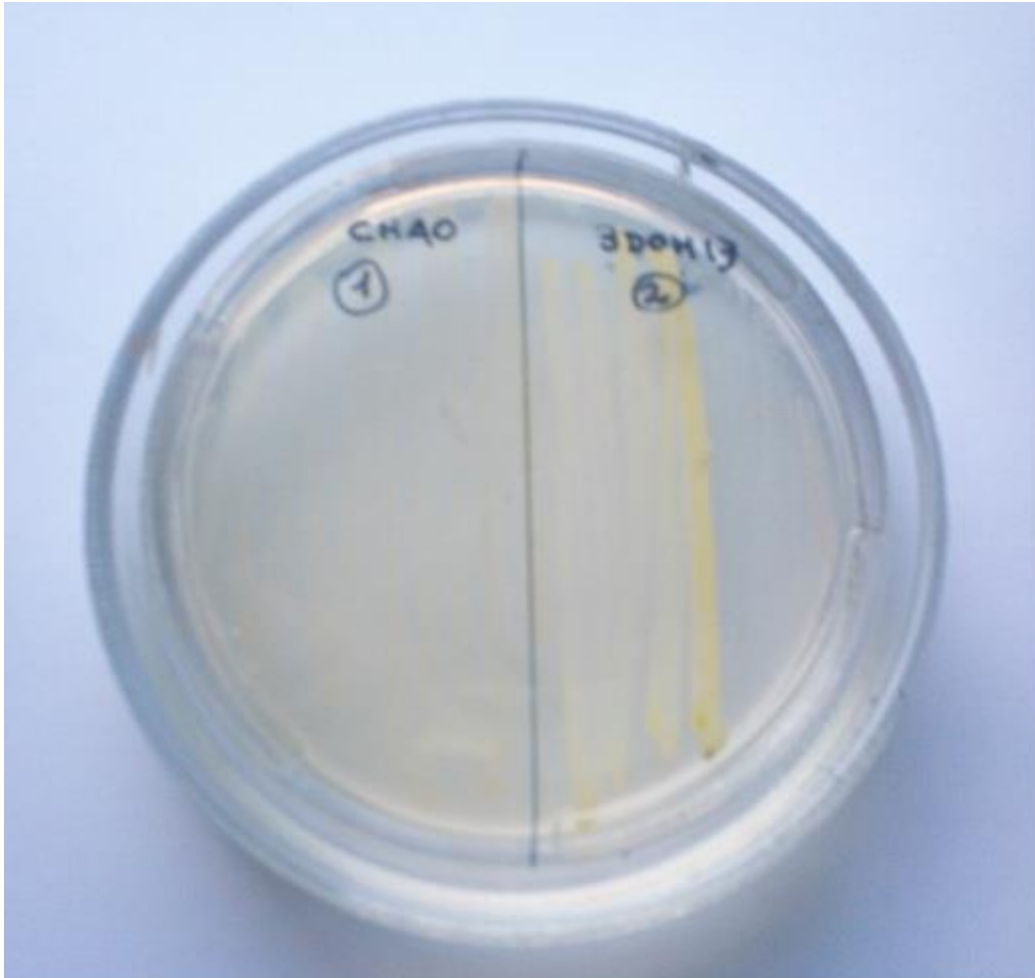
En la foto número dos, se puede observar un medio YEMA, en donde la cepa *P. fluorescens* CHAO se sembró en primer lugar y la cepa *S. meliloti* 3DOh13 se sembró en segundo lugar cuando el compuesto antimicrobiano producido por *P. fluorescens* CHAO ya está presente en el medio. Aquí también se puede ver el crecimiento de ambas cepas, por lo que podemos decir que las mismas pueden coexistir en el mismo medio. *P. fluorescens* CHAO no inhibe a *S. meliloti* 3DOh13.

Foto 3.- Ensayo de coexistencia en medio TSA diluído al 25% (Agar Tripticasa Soya – Laboratorio Britania, Argentina) entre las cepas bacterianas *Sinorhizobium meliloti* 3DOh13 y *Pseudomonas fluorescens* CHA0, en siembra simultánea.



En la foto número tres, se puede observar las cepas *P. fluorescens* CHA0 y *S. meliloti* 3DOh13, sembradas en simultaneo en un medio TSA diluido al 25%. Se puede ver el crecimiento de ambas cepas, por lo tanto podemos decir que las mismas pueden coexistir en este medio.

Foto 4.- Ensayo de coexistencia en medio TSA diluído al 25% (Agar Tripticasa Soya – Laboratorio Britania, Argentina) entre las cepas bacterianas *Sinorhizobium meliloti* 3DOh13 y *Pseudomonas fluorescens* CHA0, en siembra espaciada.



En la foto número cuatro, se puede observar un medio TSA diluido al 25%, donde la cepa *P. fluorescens* CHA0 se sembró en primer lugar y la cepa *S. meliloti* 3DOh13 se sembró en segundo lugar. Aquí también se puede ver el crecimiento de ambas cepas, por lo que podemos decir que las mismas pueden coexistir en el mismo medio.

Las cepas bacterianas *Sinorhizobium meliloti* 3DOh13 y *Pseudomonas fluorescens* CHA0 sembradas en los medios de cultivo YEMA (Vincent, 1970) y TSA diluído al 25% (Agar Tripticasa Soya – Laboratorio Britania, Argentina), mostraron una buena coexistencia, en ambos tipos de siembras (simultáneo y espaciadas).

Trabajos previos habían mostrado la capacidad de *S. meliloti* 3DOh13 de coexistir con otras especies de *Pseudomonas*, entre ellas la cepa SP22 que se empleó como control de solubilización en nuestros ensayos (Rosas *et al.*, 2006).

2.3.- Ensayos de inoculación y/o coinoculación de alfalfa en condiciones de invernáculo

Los valores de los parámetros de la parte radical correspondiente al promedio de las 3 repeticiones de cada tratamiento, se muestran en la tabla número 4.

Tabla 4.- Parámetros de la parte radical de plántulas de alfalfa inoculadas con *P. fluorescens* CHAO y *S. meliloti* 3DOh13. Datos a 50 días de cultivo.

Tratamiento microbiano	Longitud de raíces (cm)	Área superficial mg Ca(N03)2	Peso seco de las raíces (gr plantas ¹)	Número de nódulos por planta
<i>P. fluorescens</i> CHAO	23,93 ± 9,2 bc	1,93 ± 1,44 c	0,02 ± 0,0014	--
<i>S. meliloti</i> 3DOh13	26,68 ± 8,0 c	1,61 ± 0,58 bc	0,01 ± 0,0014	2,08 ± 2,15 a
<i>P. fluorescens</i> CHAO + <i>S. meliloti</i> 3DOh13	19,67 ± 4,6 ab	1,73 ± 0,93 c	0,017 ± 0,0	1,50 ± 1,38 a
<i>Control no inoculado y suplementado con N</i>	17,71 ± 7,8 ab	0,72 ± 0,34 a	0,006 ± 0,0007	--
<i>Control no inoculado y sin N</i>	15,22 ± 5,8 a	0,92 ± 0,68 ab	0,004 ± 0,003	--

Los datos representan la media de 12 plantas por cada tratamiento. Los valores promedios seguidas de letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) según prueba de Duncan.

Analizando longitud de raíz principal, podemos observar que hay diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento control no inoculado y sin nitrógeno, con respecto al tratamiento *S. meliloti* 3DOh13. En los demás tratamientos solo hubo diferencias estadísticamente no significativas.

También podemos observar en el tratamiento donde combinamos la bacteria *P. fluorescens* CHAO con la bacteria *S. meliloti* 3DOh13, el efecto estimulante en el crecimiento radical no es tan marcado, ya que su media se encuentra por debajo del valor obtenido por cada uno en forma individual.

Analizando el área de superficie radical, podemos observar que hay diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento control no inoculado suplementado con nitrógeno con respecto a los tratamientos con *P. fluorescens* CHAO, *S. meliloti* 3DOh13 y *P. fluorescens* CHAO + *S. meliloti* 3DOh13. También se puede observar que *P. fluorescens* CHAO presentó una mayor superficie radical con respecto a los demás tratamientos, a pesar de que no fue la que tuvo la mayor longitud en raíz principal.

Analizando peso seco radical por planta, podemos observar que el tratamiento con la cepa *P. fluorescens* CHAO y el tratamiento con *P. fluorescens* CHAO + *S. meliloti* 3DOh13 poseen un peso radical muy similar y mayor que el tratamiento con la cepa *S. meliloti* 3DOh13. Esto pudo deberse a que desarrollaron mayor cantidad de raíces de menor longitud en un mismo volumen de sustrato, lo cual se tradujo en mayor peso radical.

Analizando el número de nódulos por planta, podemos observar que si bien no hay diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento con *S. meliloti* 3DOh13 y el tratamiento con *P. fluorescens* CHAO + *S. meliloti* 3DOh13, la cantidad de nódulos es mayor en la simple inoculación. Normalmente ocurre que al co-inocular se da una competencia por sitios en la raíz entre las dos cepas involucradas (Monge *et al.*, 2007). En este caso, *Pseudomonas* tiene una velocidad de crecimiento mayor que los rizobios, lo que permite considerar su influencia en la nodulación.

Los valores de los parámetros de la parte aérea correspondiente al promedio de las 3 repeticiones de cada tratamiento, se muestran en la tabla número 5.

Tabla 5.- Parámetros de la parte aérea de plántulas de alfalfa inoculadas con *P. fluorescens* CHAO y *S. meliloti* 3DOh13. Datos a 50 días de cultivo.

Tratamiento microbiano	Longitud de tallo (cm)	Peso seco de los tallos (gr planta ⁻¹)	Estado general de las plantas
<i>P. fluorescens</i> CHAO	20,98 ± 5,75 a	0,06 ± 0,016	Bueno
<i>S. meliloti</i> 3DOh13	18,03 ± 5,46 a	0,05 ± 0,011	Bueno
<i>P. fluorescens</i> CHAO + <i>S. meliloti</i> 3DOh13	18,71 ± 7,60 a	0,04 ± 0,016	Bueno
Control no inoculado y suplementado con N	17,37 ± 6,02 a	0,03 ± 0,014	Regular
Control no inoculado y sin N	17,72 ± 5,59 a	0,02 ± 0,0	Malo

Los datos representan la media de 12 plantas por cada tratamiento. Los valores promedios seguidas de letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) según prueba de Duncan.

Analizando longitud de tallo, se puede observar, que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, sin embargo en el tratamiento con la cepa *P. fluorescens* CHAO se observó una mayor longitud de tallo con respecto a los demás tratamientos, teniendo de esta manera un mayor peso seco por planta. Cuando se inoculó con *S. meliloti* 3DOh13, se obtuvo una menor longitud de tallo comparando con el tratamiento *P. fluorescens* CHAO + *S. meliloti* 3DOh13, sin embargo el peso seco fue mayor en el tratamiento con *S. meliloti* 3DOh13, esto se debió a que las plantas presentaban un buen estado en general y mayor cantidad de ramificaciones por tallo.

En esta experiencia resultó llamativo el buen crecimiento obtenido en la inoculación simple con *P. fluorescens* CHAO. Esto nos hace plantear dos interrogantes: ¿de donde obtiene nitrógeno?, ¿CHAO podría estar actuando como fijador de vida libre?

La coinoculación no mejoró los parámetros de crecimiento respecto de las inoculaciones simples, sin embargo la misma podría ser de importancia cuando se busque proteger al sistema con el efecto biocontrolador de CHAO.

4.- CONCLUSIÓN

En los ensayos de solubilización de distintas fuentes de P en medios alternativos, pudimos observar que las cepas *Pseudomonas fluorescens* CHAO, *Sinorhizobium meliloti* 3DOh13 y la cepa control SP22, tuvieron un mejor crecimiento en el medio **Frioni**, siempre que el fósforo se encontraba como P-tricálcico; aunque también tuvieron un buen crecimiento en los demás medios suplementados con calcio.

A nivel individual la cepa *P. fluorescens* CHAO, tuvo un buen crecimiento en los tres medios utilizados (FRIONI, PVK, NBRIP) cuando el fósforo se encontraba como P-tricálcico, siempre presentando halo, lo que indica su capacidad de solubilizar el fósforo en estas condiciones.

La cepa *Sinorhizobium meliloti* 3DOh13, fue la que evidenció mejor crecimiento en el medio Pikovskaya (PVK), cuando el fósforo se encontraba como P-Aluminio. Esta cepa no produjo halo en ningunos de los tres medios utilizados, sin embargo no podemos decir que la misma no tiene capacidad de solubilizar fósforo en estas condiciones de cultivo.

Con estos resultados observados, podemos inferir que la detección a nivel de laboratorio de la solubilización microbiana de fosfatos a partir de una misma fuente insoluble se encuentra influenciada por la composición del medio de cultivo.

En cuanto al crecimiento de las plantas, podemos concluir que la inoculación de las plántulas de alfalfa con microorganismos promotores del crecimiento vegetal, en condiciones de baja disponibilidad de fósforo, favorece el crecimiento de los cultivos. Esto se evidencia en el aumento de la longitud del tallo, el aumento del área radical y el buen estado general de las plantas.

Con estos resultados podemos decir que el uso de estos microorganismos PGPR, favorecen el crecimiento de los cultivos en condiciones de baja concentración de fósforo, contribuyendo una alternativa para limitar el uso de fertilizantes químicos.

BIBLIOGRAFÍA

AHMAD, F., I. AHMAD y M.S. KHAN. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.* 163: 173-181.

AL-NIEMI, T.S., M.S. KAHN y T.R. MC DERMOTT. 1997. P metabolism in the bean-*Rhizobium tropici* symbiosis. *Plant Physiol.* 113: 1233-1242.

ARDEBILI, Z.O., N.O. ARDEBILI y S.M. HAMDÍ. 2011. Physiological effects of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants and its possible impact on *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *Aust. J. Crop Sci.* 5: 1631-1638.

BASHAN, Y. y G. HOLGUIN. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.* 43: 103-121.

BROWNE, P., O. RICE, S.H. MILLER, J. BURKE, D.N. DOWLING, J.P. MORRISSEY y F. O'GARA. 2009. Superior inorganic phosphate solubilization is linked to phylogeny within the *Pseudomonas fluorescens* complex. *App. Soil Ecol.* 43:131-138.

CARLEY, H.E. y R.D. WATSON. 1966. A new gravimetric method for estimating root-surface areas. *Soil Science* 102: 289-291.

CASSMAN, K.G. A.S. WHITENY y R.L. FOX. 1981. Phosphorus requirements of soybean and cow pea as affected by mode of N nutrition. *Agron. J.* 73: 17-22

CHABOT, R., H. ANTOUN y P. CESAS. 1993. Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. *Can. J. Microbiol.* 39: 941-947.

CHABOT, R., H. ANTOUN y CESAS, MP. 1996. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Plant Soil* 184: 311-321.

COLLINO, D.J., A. LOPEZ, J. DARDANELLI, R. SERENO y R.W. RACCA. 1997. Effect of soil water availability on water use strategies and dry matter production by two alfalfa cultivars differing in winter dormancy". *PHYTON* 61 (1/2): 45-53.

Contribución a una producción sostenible de alfalfa mediante el manejo de microorganismos rizosféricos en Argentina, Chile y Uruguay. 2007. Proyecto FTG-13/2001. Convenio FTG/RF-01-03-RG. Informe técnico final. Pág. 5. Disponible en: http://www.procisur.org.uy/proyectos/pdfs/14_ALFALFA_Informe_Tecnico_Final.pdf. Consultado: 10/04/2013.

DE-BASHAN, L.E. y Y. BASHAN. 2004. Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997-2003). *Water Res* 38: 4222-4246.

- DEFAGO, G., C.H. BERLING, U. BURGER, D. HAAS, G. KAHR, C. KEEL, C. VOISARD, P. WIRTHNER y B. WUTHRICH. 1990. Suppression of black root rot of tobacco and other diseases by strains of *Pseudomonas fluorescens*: Potential applications and mechanisms. En: HORNBY, D., R.J. COOK, Y. HENIS, W.H. KO, A.D. ROVIRA, B. SCHIPPERS, P.R. SCOTT (Eds). Biological control of soil-borne plant pathogens. CAB International, Oxon, UK, pp. 93–108.
- DE SOUZA J.T., M. MAZZOLA y J.M. RAAIJMAKERS. 2003. Conservation of the response regulator gene *gacA* in *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol.* 5:1328–1340.
- DUBOIS, M. 1999. La oferta varietal de alfalfa. *Génesis XII* 38:14-19.
- FERNÁNDEZ, L.A., B. AGARAS, P. ZALBA, L.G. WALL y C. VALVERDE. 2012. *Pseudomonas* spp. isolates with high phosphate-mobilizing potential and root colonization properties from agricultural bulk soils under no-till management. *Biol. Fertil. Soils* 48: 763-773.
- FERNÁNDEZ, L.A., P. ZALBA, M.A. GÓMEZ y M.A. SAGARDOY. 2007. Phosphate-solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions. *Biol. Fertil. Soils* 43:805-809.
- FRIONI, L. 1992. Ecología microbiana del suelo. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 519p.
- GHADERI A., N. ALIASGHARZAD, S. OUSTAN y P.A. OLSSON. 2008. Efficiency of three *Pseudomonas* isolates in releasing phosphate from an artificial variable-charge mineral (iron III hydroxide). *Soil & Environ.* 27: 71-76.
- GUIÑAZÚ, L.B. 2009. Utilización de microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPR'S) en el mejoramiento de la productividad de alfalfa. Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina. p: 52-55.
- GUPTA, R., R. SINGAL, A. SHANKAR, R.C. KUHAD y R.K. SAXENA. 1994. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 40: 255-260.
- GYANESHWAR, P., G. NARESH KUMAR, J.L. PAREKH y P.S. POOLE. 2002. Role of soils microorganisms in improving P nutrition in plants. *Plant Soil* 245: 83-93.
- HALDER, A.K., A. MISRA y P.K. CHAKRABARTY. 1991. Solubilization of inorganic phosphates by *Bradyrhizobium*. *Indian J. Exp. Biol.* 29: 28–31.
- HALDER, A.K., A. BANERJEE, A. MISRA y P.K. CHAKRABARTY. 1992. Role of ammonium and nitrate on release of soluble phosphate from hydroxyapatite by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *J. Basic Microbiol.* 32: 325–330.
- HAAS, D. y G. DÉFAGO. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:307–319.

HIJANO, E.H. y D.H. BASIGALUP. 1995. El cultivo de la alfalfa en la Argentina. En: La alfalfa en la Argentina. Hijano E.H. y A. Navarro Eds. INTA. p: 12-18.

INFOSTAT, 2004. **Infostat, versión 2004**. Grupo Infostat, F. C. A. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

KARTHIKEYAN M., K. RADHIKA, S. MATHIYAZHAGAN, R. BHASKARAN, R. SAMIYAPPAN y R. VELAZHAHAN. 2006. Induction of phenolics and defense-related enzymes in coconut (*Cocos nucifera* L.) roots treated with biological agents. *Braz. J. Plant Physiol.* 18: 367-377.

KHAN, M.S., A. ZAIDI y P.A. WANI. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in a sustainable agriculture – A review. *Agron. Sustain. Dev.* 27: 29-43.

KLOEPPER, J.W. y M.N. SCHROTH. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. En: Proceedings of the IVth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Vol. 2, Station de Phatologie Végétale et Phytobactériologie, INRA, Angers, France, p. 879–882.

KNIGHT, T.J. y P.J. LANGSTON-UNKEFERJ. 1988. Enhancement of symbiotic dinitrogen fixation by a toxinreleasing plant pathogen. *Science* 241: 951-954.

KOUAS, S., N. LABIDI, A. DEBEZ y C. ABDELLY. 2005. Effect of P on nodule formation and N fixation in bean. *Agron. Sustain. Dev.* 25: 389-393.

LUGTENBERG, B. y F. KAMILOVA. 2009. Plant-growth promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63:541–556.

MONGE, M. P., M. GORDON, A. AUDISIO, M. VILLA, C. OLMEDO Y J. ANDREÍ. 2007. Evaluación de la inoculación mixta Bradyrhizobium- Bacillus sobre aspectos fisiológicos del crecimiento de maní en condiciones de invernáculo. En: Libro del VI Encuentro Nacional Científico técnico REBIOS. Publicado en CD del Evento. De Biología del Suelo- VI Encuentro sobre Fijación Bilógica de Nitrógeno. C Olmedo, A Thuar y E. Castro (compiladores). Versión CD-ROM ISBN 978-950-665-438-2. 10 paginas formato pdf.

MUSLERA PARDO, E. y C. RATERA GARCÍA. 1984. La alfalfa. En: *Praderas y forrajes*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España. p: 625-694.

NAUTIYAL, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170: 265–270.

PIKOVSKAYA, R.I. 1948 Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 17: 362-370.

RACCA, R.W., D. BASIGALUP, E. BREZONI, J. DARDANELLI, N. GONZALEZ, N. HANSEN, E. LOPEZ, A. PERTICARI, A. CUADRELLI y E.

- RIVERO. 1998. Cuantificación de la FBN en alfalfa y caracterización de los factores ambientales que la regulan. XIX Reunión Latinoamericana de Rhizobiología, Maturín, Venezuela.
- RAMAMOORTHY V., T. RAGUCHANDER y R. SAMIYAPPAN. 2002. Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pf1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *Plant Soil* 239: 55–68.
- RAMETTE, A., M. FRAPOLLI, M. FISCHER-LESAUX, C. GRUFFAZ, J.M. MEYER, G. DÉFAGO, L. SUTRA y Y. MOËNNE-LOCCOZ. 2011. *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst. Appl. Microbiol.* doi: 10.1016/j.syapm.2010.10.005
- RAVINDRA N.P., G. RAMAN, K.B. NARAYANAN y N. SAKTHIVEL. 2008. Assesment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. *BMC Microbiol* 8: 230.
- REMANS, R., A. CROONENBORGH, R. TORREZ GUTIERREZ, J. MICHIELS y J. VANDERLEYDEN. 2007. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on nodulation of *Phaseolus vulgaris* L. are dependent on plant P nutrition. *Eur. J. Plant Pathol.* 119: 341-351.
- RICHARDSON. A.E., J.M. BAREA, A.M. MCNEILL y C. PRINGET-COMBARET. 2009. Acquisition of P and N in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321:305–339.
- RICHARDSON, A.E. y R.J. SIMPSON. 2011. Soil microorganisms mediating phosphorus availability. *Plant Physiol.* 156:989–996.
- RODRÍGUEZ, H. y R. FRAGA. 1999. Phosphate-solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotech. Adv.* 17: 319–339.
- ROSAS, S.B., J.A. ANDRÉS, M. ROVERA y N.S. CORREA. 2006. Phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* can influence the rhizobia–legume symbiosis. *Soil Biol. Biochem.* 38: 3502-3505.
- SARAVANAN T., R. BHASKARAN y M. MUTHUSAMY. 2004. *Pseudomonas fluorescens* induced enzymological changes in banana roots against *Fusarium* wilt disease. *Plant Pathology J.* 3: 72-80.
- SCHULZE, J., G. TEMPLE, S.J. TEMPLE, H. BESCHOW y C.P. VANCE. 2006. Nitrogen fixation by white lupin under phosphorus deficiency. *Ann. Botany* 98: 731-740.
- SINDHU, S.S., S.K. GUPTA, S. SUNEJA y K.R. DADARWAL. 2002. Enhancement of green gram nodulation and growth by *Bacillus* species. *Biol. Plantarum* 45: 117-120.

URIOSTE, A.M., A.A. BONO, D.E. BUSCHIAZZO, G.G. HEVIA y E.N. HEPPER. 1996. Fracciones de fósforo en suelos agrícolas y pastoriles de la región semiárida pampeana central (Argentina). *Ciencia del Suelo* 14: 92-95.

VINCENT, J.M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. International Biology Programme Handbook N° 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford, U.K. p: 120-130.

VIGLIZZO, E.F. 1995. El rol de la alfalfa en los sistemas de producción. En: HIJANO, E.H. y A. NAVARRO (Eds). *La alfalfa en la Argentina*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Buenos Aires, Argentina. p: 260-272.

WANI, P.A., M.S. KHAN y A. ZAIDI. 2007. Synergistic effects of the inoculation with nitrogen-fixing and phosphate -solubilizing rhizobacteria on the performance of field-grown chickpea. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 170: 283-287.

ANEXO

Foto 1.- Lote de plántulas de alfalfa analizadas.



Foto 2.- Plántulas de alfalfa inoculadas con la cepa bacteriana *Pseudomonas fluorescens* CHA0, regadas alternativamente con agua destilada y solución de Jensen modificada.



Foto 3.- Plántulas de alfalfa inoculadas con la cepa bacteriana *Sinorhizobium meliloti* 3DOh13, regadas alternativamente con agua destilada y solución de Jensen modificada.



Foto 4.- Plántulas de alfalfa control inoculadas con la cepa bacteriana *Sinorhizobium meliloti* 3DOh13, regadas con agua destilada alternada con solución de Jensen.



Foto 5.- Plántulas de alfalfa control inoculadas con la cepa bacteriana *Pseudomonas fluorescens* CHAO, regadas con agua destilada alternada con solución de Jensen.



Foto 6.- Plántulas de alfalfa control no inoculado y suplementado con N (0.005 g/l de KNO_3 a la solución de Jensen) y plántulas de alfalfa control no inoculado y sin N.



Medio Nbrip-Ca

24 H

Medidas resumen

Cepa	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	Ø colonia(mm)	2	4,50	0,71
CHAO	Ø colonia(mm)	2	8,00	1,41
SP22	Ø colonia(mm)	2	10,00	2,83

Medidas resumen

Cepa	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	halo (mm)	0	sd	sd
CHAO	halo (mm)	2	1,50	0,00
SP22	halo (mm)	2	2,25	0,35

72 H

Medidas resumen

Cepa	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	Ø colonia(mm)	2	4,50	0,71
CHAO	Ø colonia(mm)	2	8,00	1,41
SP22	Ø colonia(mm)	2	11,00	1,41

Medidas resumen

Cepa	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	halo (mm)	0	sd	sd
CHAO	halo (mm)	2	1,50	0,00
SP22	halo (mm)	2	3,00	1,41

120 H

Medidas resumen

Cepa	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	Ø colonia(mm)	2	6,50	0,71
CHAO	Ø colonia(mm)	2	10,50	2,12
SP22	Ø colonia(mm)	2	13,75	0,35

Medidas resumen

Cepa	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	halo (mm)	2	1,00	0,00
CHAO	halo (mm)	2	2,25	0,35
SP22	halo (mm)	2	3,75	0,35

Medio Nbrip -Fe

24 H

Medidas resumen

Cepa	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	Ø colonia(mm)	2	1,00	0,00
CHAO	Ø colonia(mm)	2	2,00	0,00
SP22	Ø colonia(mm)	2	5,00	2,83

72 H

Medidas resumen

Cepa	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	Ø colonia(mm)	2	1,25	0,35
CHAO	Ø colonia(mm)	2	2,00	0,00
SP22	Ø colonia(mm)	2	5,50	2,12

120 H

Medidas resumen

Cepa	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	Ø colonia(mm)	2	1,25	0,35
CHAO	Ø colonia(mm)	2	2,50	0,00
SP22	Ø colonia(mm)	2	5,50	2,12

Medio Nbrip -Al

24 H

Medidas resumen

Cepa	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	Ø colonia(mm)	2	1,00	0,00
CHAO	Ø colonia(mm)	2	2,75	1,06
SP22	Ø colonia(mm)	2	1,00	0,00

72 H

Medidas resumen

Cepa	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	Ø colonia(mm)	2	1,00	0,00
CHAO	Ø colonia(mm)	2	3,50	0,71
SP22	Ø colonia(mm)	2	1,00	0,00

120 H

Medidas resumen

Cepa	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	Ø colonia(mm)	2	1,00	0,00
CHAO	Ø colonia(mm)	2	3,50	0,71
SP22	Ø colonia(mm)	2	1,00	0,00

Medio PVK-Ca

24 H

Medidas resumen

CEPA	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	Ø colonia (mm)	3	3,33	0,58
CHAO	Ø colonia (mm)	3	7,33	1,53
SP22	Ø colonia (mm)	2	9,00	0,00

Medidas resumen

CEPA	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	halo (mm)	0	sd	sd
CHAO	halo (mm)	3	1,33	0,58
SP22	halo (mm)	2	3,00	0,00

72 H

Medidas resumen

CEPA	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	Ø colonia (mm)	3	3,33	0,58
CHAO	Ø colonia (mm)	3	7,67	1,53
SP22	Ø colonia (mm)	2	10,00	0,00

Medidas resumen

CEPA	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	halo (mm)	0	sd	sd
CHAO	halo (mm)	3	1,33	0,58
SP22	halo (mm)	2	4,00	0,00

120 H

Medidas resumen

CEPA	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	Ø colonia (mm)	3	3,67	0,58
CHAO	Ø colonia (mm)	3	13,33	3,51
SP22	Ø colonia (mm)	2	17,00	1,41

Medidas resumen

CEPA	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	halo (mm)	0	sd	sd
CHAO	halo (mm)	3	4,00	1,73
SP22	halo (mm)	2	6,50	0,71

MEDIO PVK-Fe

24 H

Medidas resumen

CEPA	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	Ø colonia (mm)	3	1,67	0,58
CHAO	Ø colonia (mm)	3	3,67	1,53
SP22	Ø colonia (mm)	2	5,50	0,71

72 H

Medidas resumen

CEPA	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	Ø colonia (mm)	3	2,67	0,58
CHAO	Ø colonia (mm)	3	4,67	0,58
SP22	Ø colonia (mm)	2	6,50	2,12

120 H

Medidas resumen

CEPA	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	Ø colonia (mm)	3	2,67	0,58
CHAO	Ø colonia (mm)	3	5,00	0,00
SP22	Ø colonia (mm)	2	6,50	2,12

MEDIO PVK-AI

24 H

Medidas resumen

CEPA	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	Ø colonia (mm)	3	2,33	2,31
CHAO	Ø colonia (mm)	2	1,00	0,00
SP22	Ø colonia (mm)	0	sd	sd

72 H

Medidas resumen

CEPA	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	Ø colonia (mm)	3	4,33	0,58
CHAO	Ø colonia (mm)	3	3,00	1,00
SP22	Ø colonia (mm)	2	0,50	0,00

120 H

Medidas resumen

CEPA	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	Ø colonia (mm)	3	4,33	0,58
CHAO	Ø colonia (mm)	3	3,33	0,58
SP22	Ø colonia (mm)	2	0,50	0,00

MEDIO FRIONI-Ca

24 H

Medidas resumen

Cepa	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	Ø colonia(mm)	2	3,00	0,51
CHAO	Ø colonia(mm)	2	13,00	4,25
SP22	Ø colonia(mm)	2	12,65	2,83

Medidas resumen

Cepa	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	halo (mm)	0	sd	sd
CHAO	halo (mm)	2	3,00	1,45
SP22	halo (mm)	2	5,25	2,56

72 H

Medidas resumen

Cepa	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	Ø colonia(mm)	2	3,50	0,51
CHAO	Ø colonia(mm)	2	12,10	5,74
SP22	Ø colonia(mm)	2	15,00	3,30

Medidas resumen

Cepa	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	halo (mm)	0	sd	sd
CHAO	halo (mm)	2	2,56	1,89
SP22	halo (mm)	2	4,82	1,90

120 H

Medidas resumen

Cepa	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	Ø colonia(mm)	2	4,50	0,51
CHAO	Ø colonia(mm)	2	17,70	5,52
SP22	Ø colonia(mm)	2	31,35	1,00

Medidas resumen

Cepa	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	halo (mm)	0	sd	sd
CHAO	halo (mm)	2	4,02	0,85
SP22	halo (mm)	2	9,17	2,05

MEDIO FRIONI-Fe

24 H

Medidas resumen

Cepa	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	Ø colonia(mm)	2	0,50	0,10
CHAO	Ø colonia(mm)	2	0,50	0,10
SP22	Ø colonia(mm)	2	0,50	0,10

72 H

Medidas resumen

Cepa	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	Ø colonia(mm)	2	3,25	1,85
CHAO	Ø colonia(mm)	2	1,00	0,10
SP22	Ø colonia(mm)	2	2,45	0,81

120 H

Medidas resumen

Cepa	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	Ø colonia(mm)	2	3,62	0,55
CHAO	Ø colonia(mm)	2	1,50	0,10
SP22	Ø colonia(mm)	2	2,50	0,56

MEDIO FRIONI-AI

24 H

Medidas resumen

Cepa	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	Ø colonia(mm)	2	0,50	0,10
CHAO	Ø colonia(mm)	2	0,50	0,10
SP22	Ø colonia(mm)	2	0,50	0,10

72 H

Medidas resumen

CEPA	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	Ø colonia (mm)	3	3,63	1,56
CHAO	Ø colonia (mm)	3	5,00	0,10
SP22	Ø colonia (mm)	2	2,25	0,20

120 H

Medidas resumen

CEPA	Variable	n	Media	D.E.
3DOH13	Ø colonia (mm)	3	5,75	1,25
CHAO	Ø colonia (mm)	3	4,33	1,58
SP22	Ø colonia (mm)	2	3,25	1,76

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
LONGITUD RAIZ (cm)	60	20,64	8,21	0,95	0,0741
LONGITUD TALLO (cm)	60	18,56	6,06	0,95	0,1116
TITULACION (ml)	60	1,38	0,97	0,83	<0,0001

Análisis de la varianza

LONGITUD RAIZ (cm)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
LONGITUD RAIZ (cm)	60	0,26	0,21	35,43

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1035,21	4	258,80	4,84	0,0020
TRATAMIENTO	1035,21	4	258,80	4,84	0,0020
Error	2941,07	55	53,47		
Total	3976,28	59			

Test:Duncan Alfa=0,05*Error: 53,4740 gl: 55*

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.			
5,00	15,22	12	2,11	A		
4,00	17,71	12	2,11	A	B	
3,00	19,67	12	2,11	A	B	
1,00	23,93	12	2,11		B	C
2,00	26,68	12	2,11			C

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)***LONGITUD TALLO (cm)**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
LONGITUD TALLO (cm)	60	0,05	0,00	33,06

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	99,31	4	24,83	0,66	0,6227
TRATAMIENTO	99,31	4	24,83	0,66	0,6227
Error	2069,98	55	37,64		
Total	2169,29	59			

Test:Duncan Alfa=0,05*Error: 37,6360 gl: 55*

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.	
4,00	17,37	12	1,77	A
5,00	17,72	12	1,77	A
2,00	18,03	12	1,77	A
3,00	18,71	12	1,77	A
1,00	20,98	12	1,77	A

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

AREA SUPERFICIAL (mg)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
AREA SUPER.(mg)	60	0,24	0,19	63,54

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	13,58	4	3,40	4,42	0,0036
TRATAMIENTO	13,58	4	3,40	4,42	0,0036
Error	42,29	55	0,77		
Total	55,88	59			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,7689 gl: 55

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.			
4,00	0,72	12	0,25	A		
5,00	0,92	12	0,25	A	B	
2,00	1,61	12	0,25		B	C
3,00	1,73	12	0,25			C
1,00	1,93	12	0,25			C

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

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Nº NODULOS	24	0,03	0,00	100,91

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,04	1	2,04	0,62	0,4378
TRATAMIENTO	2,04	1	2,04	0,62	0,4378
Error	71,92	22	3,27		
Total	73,96	23			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 3,2689 gl: 22

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.	
3,00	1,50	12	0,52	A
2,00	2,08	12	0,52	A

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

CALCULO DE DESVIOS

TRATAMIENTO	Variable	n	Media	D.E.
2,00	N° NODULOS	12	2,08	2,15
3,00	N° NODULOS	12	1,50	1,38

CALCULO DE DESVIOS

TRATAMIENTO	Variable	n	Media	D.E.
1,00	LONGITUD RAIZ (cm)	12	23,93	9,26
1,00	LONGITUD TALLO (cm)	12	20,98	5,75
1,00	AREA SUPERFICIAL (mg)	12	1,93	1,44
2,00	LONGITUD RAIZ (cm)	12	26,68	8,05
2,00	LONGITUD TALLO (cm)	12	18,03	5,46
2,00	AREA SUPERFICIAL (mg)	12	1,61	0,58
3,00	LONGITUD RAIZ (cm)	12	19,67	4,67
3,00	LONGITUD TALLO (cm)	12	18,71	7,60
3,00	AREA SUPERFICIAL (mg)	12	1,73	0,93
4,00	LONGITUD RAIZ (cm)	12	17,71	7,83
4,00	LONGITUD TALLO (cm)	12	17,37	6,02
4,00	AREA SUPERFICIAL (mg)	12	0,72	0,34
5,00	LONGITUD RAIZ (cm)	12	15,22	5,82
5,00	LONGITUD TALLO (cm)	12	17,72	5,59
5,00	AREA SUPERFICIAL (mg)	12	0,92	0,68

CALCULO DE DESVIOS

TRATAMIENTO	Variable	n	Media	D.E.
1,00	PESO SECO RAIZ (gr)	12	0,02	0,0014
2,00	PESO SECO RAIZ (gr)	12	0,01	0,0014
3,00	PESO SECO RAIZ (gr)	12	0,017	0,000
4,00	PESO SECO RAIZ (gr)	12	0,006	0,00071
5,00	PESO SECO RAIZ (gr)	12	0,004	0,0032

CALCULO DE DESVIOS

TRATAMIENTO	Variable	n	Media	D.E.
1,00	PESO SECO TALLO (gr)	12	0,06	0,016
2,00	PESO SECO TALLO (gr)	12	0,05	0,011
3,00	PESO SECO TALLO (gr)	12	0,04	0,016
4,00	PESO SECO TALLO (gr)	12	0,03	0,014
5,00	PESO SECO TALLO (gr)	12	0,02	0,000