

VICARIO, JULIO CESAR

Estudios Filológicos

73990

2015

73990



Creer... Crear... Crecer...

Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Biología Molecular

**Estudios fisiológicos, bioquímicos y moleculares en rizobios:
aplicación como biofertilizantes para la agricultura
sustentable en maní**

TESIS DOCTORAL

Julio César Vicario
Febrero de 2015

1957

1957

1957

MFN:
Clasif:
T.957

Estudios fisiológicos, bioquímicos y moleculares en rizobios: aplicación como biofertilizantes para la agricultura sustentable en maní

Tesis doctoral que presenta el Microbiólogo, Vicario Julio César, para aspirar al título de Doctor en Ciencias Biológicas

Autor

Mic. Julio César Vicario

Director

Dr. Walter Fabián Giordano

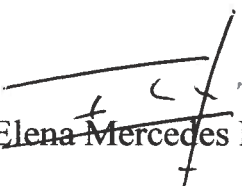
Co director

Dra. Marta Susana Dardanelli

JURADO


Dr. Oscar Adolfo Ruiz


Dr. Hernán Ramiro Lascano


Dra. Elena Mercedes Fernández

AGRADECIMIENTOS

- Al Departamento de Biología Molecular, a la FCEFQ y N y la UNRC por permitir el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral.
- A la ANPCyT y CONICET por las becas concedidas.
- A Rizobacter SA por la ayuda económica para realizar este trabajo experimental.
- A mis directores por la ayuda y el conocimiento brindado en estos 5 años de trabajo.
- A Guillermo Cerioni por la dirección, información y consejos útiles brindados para realizar los ensayos a campos.
- A Emiliano Primo por prestarme el campo y ayudarme a realizar el ensayo.
- Al grupo LASEM de la Universidad Nacional de Salta por el servicio de microscopia electrónica brindado.
- A todos mis compañeros de laboratorio y amigos, por los momentos compartidos, siempre con buena cara y un mate de por medio.
- A mi familia y novia por estar siempre cuando más los necesitaba.
- ¡Gracias a todos!

RESUMEN

El éxito de los inoculantes de rizobios en la nodulación de sus leguminosas hospedadoras, frecuentemente depende de su habilidad de competir con cepas nativas del suelo. La movilidad es una característica de los rizobios que puede contribuir en el éxito de su competitividad simbiótica. Se han identificado seis categorías de movilidad bacteriana: swimming, swarming, gliding, twitching, sliding y darting, siendo las de mayor importancia en el suelo el swimming el cual representa la capacidad de los microorganismos de moverse a través de los canales de agua o medios líquidos y el swarming el cual representa el movimiento en la superficie sólida. En contraste con el movimiento bacteriano individual que se produce en el swimming, el swarming se considera una migración grupal asociado con la superficie semisólida (Williams y Schwarzhoff 1978). Medeot y col. (2010) han demostrado la importancia que existe entre la movilidad y una correcta composición de lípidos de membrana, ya que modificaciones en la misma conlleva a un menor tamaño celular y una reducida movilidad bacteriana. Además fue observado que en el suelo los lípidos de las membranas de los rizobios pueden tener un papel vital frente a factores químicos como fungicidas y otros productos utilizados en la labranza de los cultivos.

De acuerdo a los datos existentes, la inoculación de maní ha arrojado resultados controvertidos y eso hace que se la considere como una práctica agrícola discutida en nuestro país. Sin embargo la aplicación de la cepa apropiada de rizobios, puede producir un mayor rendimiento de frutos de maní con alto contenido de proteína. Esto se refiere a la capacidad relativa de cepas particulares de ocupar nódulos en plantas huésped en presencia de otros simbioses. Los suelos de la zona manisera se caracterizan por poseer una población nativa de rizobios capaces de nodular maní, que no siempre es suficientemente eficaz. Las bacterias de la familia Rhizobiaceae interactúan con las leguminosas, de una manera huésped específico y forman nódulos fijadores de nitrógeno. Por otro lado, numerosos microorganismos pueden interactuar con las raíces de las leguminosas, como por ejemplo las bacterias del género *Azospirillum* que son de vida libre, colonizadoras de superficie, diazótrofes a veces endofíticas y que poseen propiedades de promoción del crecimiento vegetal, aumentando el rendimiento de importantes cultivos que crecen en diversas regiones climáticas.

Los estudios sobre las cinco cepas de *Bradyrhizobium* simbiotes de maní seleccionadas para esta Tesis Doctoral mostraron una capacidad de formación de biofilm altamente variables. Por el contrario, la respuesta quimiotáctica hacia el exudado de semilla, presentó un comportamiento similar entre todas las rizobacterias, observándose, un aumento en el recuento de células viables en comparación con el valor registrado para las células bajo la condición control (ausencia de exudado). Todos los rizobios mostraron capacidad swimming y swarming, siendo este último tipo de movilidad la que mostró menor variación. El comportamiento de los rizobios de estudio aislados de diferentes zonas de siembra, incluso de nuestra región, mostraron tener una respuesta no homogénea en los aspectos vinculados a eventos tempranos de interacción (formación de biofilm, adhesión, movilidad y quimiotaxis).

Los fungicidas (Carboxin + Tiram y Fludioxonil + Metalaxil) evaluados mostraron tener un efecto dispar sobre la viabilidad, movilidad y composición de ácidos grasos de los rizobios en estudio. Carboxin + Tiram provocó la inhibición del crecimiento de todos los rizobios en estudio mientras que Fludioxonil + Metalaxil, no mostró efectos sobre la viabilidad de los microorganismos. El efecto de los fungicidas sobre la movilidad no se pudo determinar en las condiciones experimentales planteadas. La exposición de las cepas de *Bradyrhizobium* a los fungicidas, provocó un cambio en el grado de saturación de los ácidos grasos de las cepas C145 y Pc34, el cual sería un mecanismo adaptativo de las bacterias para mantener las propiedades biológicas de la membrana que garanticen la viabilidad y la funcionalidad celular. Las cepas SEMIA6144 y 15A frente a estos agentes químicos mostraron una mayor tolerancia sin presentar modificaciones en el perfil de ácidos grasos.

Al analizar el efecto de diferentes estrategias de inoculación en invernadero sobre el cultivo de maní (cultivar Granoleico), se observó que las co-inoculaciones rizobios-*Azospirillum brasilense* Az39 en general marcaron una tendencia de mejora en los parámetros medidos. De las cepas nativas, 15A presentó un comportamiento similar o superior a las cepas de referencia ensayadas. Al evaluar el efecto de las diferentes estrategias de biofertilización en el campo (ubicado en la localidad de Chajan, maní cultivar Granoleico), se pudo observar un resultado positivo de la co-inoculación entre *Bradyrhizobium* C145-*Azospirillum brasilense* Az39 en comparación con las inoculaciones simples y el control sin inocular, en todos los parámetros medidos. Al evaluar el comportamiento de las cepas nativas en el campo (ubicado en la localidad de Dalmasio

Vélez, maní cultivar Granoleico), en contraste con C145, la cepa 15A registró los mejores resultados de la prueba, lo que demuestra que la selección de bacterias nativas adaptadas a suelos de maní puede ser una estrategia para el desarrollo de nuevos productos para obtener mejores rendimientos en el cultivo de maní.

Parte del trabajo incluido en esta Tesis Doctoral ha dado lugar a los siguientes artículos científicos publicados, a una mención en evento internacional y a la escritura de dos trabajos a ser enviados próximamente para su publicación asociados al estudio de los lípidos y a las co-inoculaciones:

Artículos científicos:

- **Vicario J.C.**, Dardanelli M.S., Giordano W. **2014**. Swimming and swarming motility properties of peanut-nodulating rhizobia. *FEMS Microbiology Letters* (Reino Unido) ISSN 0378-1097, Manuscript ID: FEMSLE-14-11-0944, Submitted date: 13-Nov-2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/femsle/fnu038> First published online: 4 December 2014.
- Paulucci, N.S., **Vicario J.C.**, Cesari, A.B., García, M.B., Dardanelli, M.S., Giordano. W.F. **2012**. Signals in the rhizosphere and their effects on the interactions between microorganisms and plants. *En: Bacteria in Agrobiolgy: Plant Probiotics*. Editor: Maheshwari, D. K. ISBN 978-3-642-27514-2. Springer Verlag, pp 201-211.

Mención a la Comunicación Poster:

- *II Latinamerican Workshop on PGPR*, Septiembre **2014**, La Falda, Argentina. *Co-inoculated treatment with native and reference Bradyrhizobium: alternative to enhance peanut yields*. **Vicario J.C.**, Giordano W., Dardanelli M.S.

ÍNDICE GENERAL

Índice de tablas y figuras	11
Abreviaturas empleadas	15
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	18
1.1 Antecedentes	18
1.2 Mecanismos de fijación de nitrógeno	20
1.3 Los rizobios	21
1.4 Las leguminosas	22
1.5 Simbiosis rizobio-leguminosa	23
1.6 <i>Arachis hypogaea</i> : leguminosa de importancia regional	26
1.7 Simbiosis <i>Bradyrhizobium</i> sp.- <i>Arachis hypogaea</i>	27
1.8 Inoculación	29
1.8.1 Objetivos, ventajas y dificultades de la inoculación	29
1.8.2 Supervivencia y competitividad de cepas inoculadas	30
1.8.3 Implicancia en la selección de cepas para inoculantes	31
1.8.4 Influencia del método de inoculación	31
1.8.5 Inoculación de maní	33
1.9 Papel de la movilidad bacteriana y su importancia en el suelo	34
1.10 Efecto de agroquímicos sobre la viabilidad y la composición de ácidos grasos de membrana de rizobios simbioses de maní	36
CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	39
2.1 Hipótesis	39
2.2 Objetivos	39
2.2.1 Objetivo general	39
2.2.2 Objetivos específicos	39
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS	42
3.1 Cepas bacterianas	42
3.2 Medios y condiciones de cultivo de los microorganismos	42
3.2.1 Medios de cultivo para cepas de <i>Bradyrhizobium</i> sp.	42

3.2.2 Medios de cultivo para cepas de <i>Azospirillum</i>	43
3.2.3 Soluciones nutritivas para ensayo de plantas de maní	44
3.3 Condiciones de cultivo	45
3.4 Medio de conservación	45
3.5 Estudio del crecimiento bacteriano	45
3.6 Condiciones de crecimiento vegetal	45
3.6.1 Material vegetal	45
3.6.2 Desinfección superficial y germinación de semillas	46
3.6.3 Obtención de exudados de semilla	46
3.7 Estudios de formación de biofilm	46
3.7.1 Ensayo de microplacas	46
3.7.2 Cuantificación de la formación de biofilm	47
3.8 Ensayos de movilidad	47
3.8.1 Swimming (agar 0,3%)	47
3.8.2 Swarming (agar 0,5%)	47
3.8.3 Influencia de diferentes factores sobre la movilidad bacteriana	47
3.9 Microscopía electrónica de barrido	48
3.10 Extracción de lípidos	48
3.11 Análisis de ácidos grasos	49
3.12 Ensayo de co-inoculación en invernadero	49
3.13 Ensayos de inoculación a campo	50
3.13.1 Ensayo a campo, campaña 2010-2011	50
3.13.2 Ensayo a campo campaña 2013-2014	50
3.14 Análisis estadístico	51
CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
4.1 Selección de rizobios simbioses de maní para estudios de movilidad y quimiotaxis	52
4.2 Caracterización de la movilidad de rizobios simbioses de maní	53
4.2.1 Caracterización de la concentración de agar para la observación de la movilidad de rizobios simbioses de maní	54
4.2.2 Ensayo de movilidad tipo swimming (agar 0,3%)	55
4.2.3 Ensayo de movilidad tipo swarming (agar 0,5%)	58

4.3 Influencia de diferentes factores sobre la movilidad bacteriana	61
4.3.1 Ensayo de movilidad tipo swimming y swarming a temperatura sub- óptima de crecimiento bacteriano (23 °C)	62
4.3.2 Ensayo de movilidad tipo swimming y swarming a diferentes tiempos de incubación	65
4.3.3 Ensayo de movilidad tipo swarming con diferentes fuentes de carbono	66
4.3.4 Efecto de exudados de semilla de maní sobre la movilidad swimming y swarming	69
4.4 Tamaño celular de células obtenidas de ensayos de movilidad tipo swarming	72
4.5 Efecto de agroquímicos sobre rizobios simbioses de maní	74
4.5.1 Efecto de fungicidas sobre la viabilidad de los rizobios de estudio	75
4.5.2 Efecto de fungicidas sobre la movilidad	76
4.5.3 Efecto de fungicidas sobre la composición lipídica de los rizobios de estudio	78
4.6 Ensayos de co-inoculación de <i>Bradyrhizobium-Azospirillum</i> sobre maní	81
4.6.1 Preparación del ensayo de co-inoculación en condición de invernadero	82
4.6.1.1 Determinación de valores de longitud de tallo y raíz de plantas inoculadas	82
4.6.1.2 Determinación de valores de peso seco de parte aérea y raíz de plantas inoculadas	84
4.6.1.3 Determinación de parámetros de nodulación de plantas inoculadas	86
4.6.1.4 Análisis estadístico multivariado de componentes principales	89
4.6.2 Ensayos de inoculación a campo	92
4.6.2.1 Análisis químico de los suelos experimentales	93
4.6.2.2 Ensayo a campo, campaña 2010-2011	94
4.6.2.3 Ensayo a campo, campaña 2013-2014	95
4.6.2.3.1 Parámetros de crecimiento y nodulación de plantas de 60 días	96
4.6.2.3.2 Parámetros de crecimiento y nodulación de plantas a cosecha	98
4.6.2.3.3 Análisis Multivariado	101

CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES	104
CAPÍTULO 6 BIBLIOGRAFÍA	106

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1.	Relación porcentual de los radios de la movilidad tipo swimming (A) y swarming (B) hacia exudado de semillas de maní.	72
Tabla 2.	Efecto de los fungicidas MT y FM sobre la composición de ácidos grasos de los lípidos de <i>Bradyrhizobium</i> .	81
Tabla 3.	Análisis de suelos experimentales.	93
Tabla 4.	Efecto de la inoculación de maní en el rendimiento de frutos (cajas). Los valores son expresados como Kg ha ⁻¹	95
Figura 1	Mecanismos de infección de las leguminosas	24
Figura 2	Características botánicas relacionadas a <i>A. hypogaea</i>	27
Figura 3	Capacidad de formación de biofilm de rizobios simbiotes de maní nativos y recomendados	53
Figura 4	Movilidad de rizobios simbiotes de maní sobre medio agar agua a diferentes concentraciones.	54
Figura 5	Movilidad swimming de rizobios simbiotes de maní en diferentes soportes. A medio agar agua 0,3%, B medio agar agua 0,3% + 10% YEM, C medio YEM 0,3% y D medio TY 0,3%.	56
Figura 6	Movilidad de rizobios simbiotes de maní sobre medio agar agua, agar agua + 10% YEM, YEM y TY con una concentración de agar del 0,3%.	57
Figura 7	Movilidad swarming de rizobios simbiotes de maní sobre agar agua + 10% YEM con una concentración de agar del 0,3%.	58
Figura 8	Movilidad swarming de rizobios simbiotes de maní en diferentes soportes. A medio agar agua 0,5%, B medio agar agua 0,5% + 10% YEM, C medio YEM 0,5% y D medio TY 0,5%.	59
Figura 9	Movilidad de rizobios simbiotes de maní sobre medio agar agua, agar agua + 10% YEM, YEM y TY con una concentración de agar del 0,5%.	60
Figura 10	Movilidad swarming de rizobios simbiotes de maní sobre agar agua + 10% YEM con una concentración de agar del 0,5%.	61
Figura 11	Movilidad de rizobios simbiotes de maní sobre agar-agua + 10% de YEM a temperatura subóptima de 23 °C. A medio agar agua	63

0,3% + 10% YEM y **B** medio agar agua 0,5% + 10% YEM.

- Figura 12** Movilidad de rizobios simbioses de maní a 23 °C y 30 °C. **A** 64
medio agar agua 0,3% + 10% YEM y **B** medio agar agua 0,5% +
10% YEM.
- Figura 13** Movilidad de rizobios simbioses de maní sobre agar agua + 10% 66
YEM a 8, 16, 24 y 32 días de incubación. **A** medio agar agua
0,3% + 10% YEM y **B** medio agar agua 0,5% + 10% YEM.
- Figura 14** Movilidad swarming de rizobios simbioses de maní sobre agar 68
agua 0,5% + 0,1% de diferentes fuentes de carbono. **A** medio agar
agua 0,5% + 0,1% glucosa, **B** medio agar agua 0,5% + 0,1%
fructosa, **C** medio agar agua 0,5% + 0,1% manosa, **D** medio agar
agua 0,5% + 0,1% arabinosa y **E** medio agar agua 0,5% + 0,1%
manitol.
- Figura 15** Movilidad swarming de rizobios simbioses de maní sobre agar 69
agua 0,5% + 0,1% de diferentes fuentes de carbono.
- Figura 16** Movilidad swimming (**A**) y swarming (**B**) de rizobios simbioses 71
de maní sobre agar agua 0,3% y 0,5% respectivamente + 10%
YEM con el agregado de 8 µl de exudados de semilla concentrado
10 veces.
- Figura 17** Longitud obtenida por SEM de células vegetativas y swarm de 73
rizobios nodulantes de maní.
- Figura 18** Fotografías de células vegetativas y swarm (tomadas del frente del 74
halo de movilidad) de rizobios simbioses de maní. **A** C145
células vegetativas, **B** C145 células swarm, **C** SEMIA6144 células
vegetativas, **D** SEMIA6144 células swarm, **E** USDA4438 células
vegetativas, **F** USDA4438 células swarm, **G** 15A células
vegetativas, **H** 15A células swarm, **I** Pc34 células vegetativas y **J**
Pc34 células swarm.
- Figura 19** Crecimiento de los rizobios de estudio en medio YEM al 1,5% con 76
el agregado de 0,2% de MT (placa roja) y 0,1% de FM (placa
azul).
- Figura 20** Movilidad swimming de rizobios simbioses de maní sobre agar 77
agua 0,3% + 10% YEM + 0,2% de MT. **A** C145, **B** SEMIA6144,

C USDA4438, D 15A, E Pc34.

- Figura 21** Movilidad swimming de rizobios simbioses de maní sobre agar 78
agua 0,3% + 10% YEM + 0,1% de FM. A C145, B SEMIA6144,
C USDA4438, D 15A, E Pc34.
- Figura 22** Efecto de la inoculación de bradyrizobios y *A. brasilense* Az39, 83
sobre el largo de tallo (A) y de raíz (B) de plantas de maní de 32
días de crecimiento.
- Figura 23** Efecto de la inoculación de bradyrizobios y *A. brasilense* Az39, 85
sobre el peso seco de tallo (A) y de raíz (B) de plantas de maní de
32 días de crecimiento.
- Figura 24** Efecto de la inoculación de bradyrizobios y *A. brasilense* Az39, 88
sobre el número de nódulos de raíz principal y lateral (A), el
número total de nódulos (B) y el peso seco de nódulos (C) de
plantas de maní de 32 días de crecimiento.
- Figura 25** Efecto de las diferentes estrategias de inoculación sobre plantas de 89
maní de 32 días de crecimiento, con las cepas de referencia de
Bradyrhizobium C145 y *A. brasilense* Az39 en comparación con el
control sin inocular.
- Figura 26** Gráfico bi-plot obtenido con el programa estadístico InfoStat 91
versión 1.0.
- Figura 27** Campo experimental ubicado en la localidad cordobesa de 96
Dalmasio Vélez Sarfield, 60 días post siembra.
- Figura 28** Efecto de la inoculación de bradyrizobios y *A. brasilense* Az39, 97
sobre el largo de tallo (A) y peso seco de parte aérea (B).
- Figura 29** Efecto de la inoculación de bradyrizobios y *A. brasilense* Az39, 98
sobre el número total de nódulos por planta.
- Figura 30** Efecto de la inoculación de bradyrizobios y *A. brasilense* Az39, 100
sobre peso seco de parte aérea (A), número total de nódulos (B) y
el peso seco de nódulos (C).
- Figura 31** Efecto de la inoculación de bradyrizobios y *A. brasilense* Az39, 101
sobre peso seco de cajas.
- Figura 32** Gráfico bi-plot obtenido con el programa estadístico InfoStat 103
versión 1.0.

Figura 33 Modelo interactivo que refleja los efectos conjuntos derivados de la biofertilización sobre el crecimiento y producción del cultivo de maní. 104

ABREVIATURAS EMPLEADAS

AG: ácido graso

ANOVA: análisis de la varianza

ATP: adenina tri fosfato

°C: grados Celsius

cm: centímetro

cm³: centímetro cúbico

CPS: polisacárido capsular

c.s.p.: cantidad suficiente para

CV: cristal violeta

DO: densidad óptica

EPS: exopolisacárido

FAME: ésteres metílicos de ácidos grasos

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura

FBN: fijación biológica de nitrógeno

FM: Fludioxonil 2,5%+ Metalaxil 1%

g: gramo

GC: cromatografía gaseosa

h: hora

ha: hectárea

INTA: Instituto Nacional Tecnología Agropecuaria

I/S: relación AG insaturados/saturados

Kg: kilogramo

l: litro

LB: medio de cultivo Luria-Bertani

LPS: lipopolisacárido

M: molar

m: metro

m²: metro cuadrado

mg: miligramo

min: minuto

ml: mililitro

- mm:** milímetro
- mM:** milimolar
- MT:** Carboxin 20 % + Tiram 20 %
- N:** nitrógeno
- nm:** nanómetro
- nod:** nódulos
- N₂O:** óxido nitroso atmosférico
- PC:** componente principal
- PGPR:** rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal
- pH:** potencial de hidrógeno
- PHBA:** ácido poli-beta-hidroxibutírico
- PL:** fosfolípidos
- ppm:** parte por millón
- PS:** peso seco
- p/v:** porcentaje peso/volumen
- RL:** raíz lateral
- RP:** raíz principal
- rpm:** revoluciones por minuto
- s:** segundo
- SAGPyA:** Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
- SD:** desvió estándar
- SEM:** microscopia electrónica de barrido
- TSA:** tripteina soya agar
- TY:** triptone- Yeast extract
- UFC:** unidades formadoras de colonias
- µg:** microgramo
- µl:** microlitro
- µm:** micrómetro
- µM:** micromolar
- UMSIIA:** Unidad Ministerial del Sistema Integrado de Información Agropecuaria
- USDA:** Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
- US\$:** dólar estadounidense
- %:** porcentaje

% v/v: porcentaje volumen/volumen

YEM: medio manitol-extracto de levadura

YEMA: medio manitol-extracto de levadura-agar

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

En los últimos 40 años, el uso de los fertilizantes nitrogenados sintéticos ha aumentado 7 veces, mientras que el uso de plaguicidas se ha acrecentado unas 3 veces. De continuar las prácticas actuales con igual ritmo de consumo, en la aplicación de ambos tipos de productos se prevé un incremento adicional de 3 veces hacia el año 2050 (Tilman y col. 2001). Paradójicamente, a pesar de este hecho, el potencial de rendimiento de los principales cultivos alimentarios básicos se mantiene prácticamente constante y se estima un ligero aumento hacia 2030 (FAO 2002). Los modelos de análisis propuestos muestran que la primera adición de fertilizantes nitrogenados induce el mayor aumento en el rendimiento de los cultivos, con la consiguiente disminución de la respuesta a niveles superiores de aplicación (Frink y col. 1999). Además, la intensificación agrícola y el cultivo continuo pueden resultar en una pérdida de la materia orgánica del suelo disminuyendo su fertilidad, lo que entonces impulsa al aumento de la aplicación de fertilizantes sintéticos y plaguicidas. Los fertilizantes químicos tienen una baja eficiencia de uso, lo que significa que sólo una porción de los nutrientes aplicados pueden ser utilizados por las plantas y su empleo excesivo puede causar efectos negativos en el medio ambiente (Gyaneshwar y col. 2002).

Una vía potencial para reducir el efecto negativo del uso constante y desmesurado de fertilizantes químicos es la inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), las cuales ejercen efectos benéficos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas. Uno de los principales mecanismos por los cuales realizan dichos efectos es aumentando la disponibilidad de nutrientes y la eficiencia de su uso (Rodríguez y Fraga 1999). Se observó que ciertas PGPR pueden influenciar el crecimiento de la planta a través de la síntesis de hormonas, facilitar la absorción de nutrientes desde el suelo por diferentes mecanismos como la fijación biológica del nitrógeno atmosférico (FBN), la solubilización de fósforo y la síntesis de sideróforos para la biodisponibilidad del hierro y captura por parte de la planta (Adesemoye y col. 2009).

Las PGPRs comprenden una población mixta de microorganismos naturales del suelo que pueden ser aplicados como inoculantes. Investigaciones han demostrado que la incorporación de comunidades eficientes de microorganismos al suelo no solo puede incrementar el rendimiento de los cultivos sino también la sanidad y calidad de los mismos (Singh y col. 2011).

A pesar de que el término agricultura sustentable ha sido incorporado internacionalmente en los circuitos gubernamentales y no gubernamentales relacionados con la problemática agrícola, existen diversas interpretaciones acerca de su significado. Para la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) la agricultura sustentable es el manejo y conservación de los recursos naturales y la orientación de cambios tecnológicos e institucionales de manera de asegurar la satisfacción de las necesidades humanas en forma continuada para la presente y futuras generaciones. Tal desarrollo sustentable conserva el suelo, el agua y los recursos genéticos los animales y vegetales; no degrada al medio ambiente; es técnicamente apropiado, económicamente viable y socialmente aceptable (von der Weid 1994).

Ciertas prácticas agrícolas aplicadas en conjunto y asociadas a la agricultura sustentable permiten aumentar la eficiencia y la sostenibilidad de la producción agrícola, incluida la gestión integrada de plagas, el mejoramiento de control de drenaje de agua, la adecuada aplicación de fertilizantes y la maximización de la FBN mediante la incorporación de rizobios que fijan eficientemente nitrógeno (N) a los cultivos de leguminosas (Frink y col. 1999; Ruttan 1999), es decir bacterias que convierten el N atmosférico en amoníaco y otras fuentes utilizables por las plantas (Lugtenberg y Kamilova 2009). La gran mayoría del N fijado biológicamente se debe a la simbiosis entre plantas leguminosas y especies de rizobios, estimándose que el reemplazo de esta fuente de fertilizantes naturales por fertilizantes nitrogenados sintéticos costaría más de US\$ 10 mil millones al año (Graham y Vance 2003).

La FBN eficaz puede reducir significativamente la necesidad de usar fertilizantes nitrogenados sintéticos. Una estimación de US\$ 50-90 millones de retorno, podría provenir de la rotación de los cultivos de alfalfa y maíz, en el medio oeste de los Estados Unidos. En la década del 90 en Brasil, la soja inoculada con rizobios fue responsable del ahorro de unos US\$ 1,3 mil millones por año, en los costos de producción (Fox y col. 2007). En Argentina, no se dispone en la actualidad de estimaciones de la tasa de FBN global ni del ahorro en costos de producción. Si se efectúa una estimación conservadora, que considere que la tasa de aporte de la FBN equivale al 50% del N total acumulado por el cultivo de soja, ésta arroja una cifra de 1,6 millones de toneladas de N ingresadas por esta vía. Este valor supera la totalidad del consumo anual de fertilizantes en Argentina (Melgar 2005). Además de los beneficios económicos al utilizar la FBN para reducir la dependencia de los fertilizantes, son evidentes los beneficios ambientales. Si las estimaciones son escasas para

los cultivos de gran impacto nacional con una gran superficie de siembra, más aun lo es para un cultivo regional como es el caso de *Arachis hypogaea* L. (maní), por lo que todos los temas vinculados a esta leguminosa resultan ser de gran relevancia.

1.2 Mecanismos de fijación de nitrógeno

El ciclo del N es un ciclo biogeoquímico complejo e importante que tiene un gran impacto en la fertilidad del suelo (Jetten 2008). El ciclo está dominado por cuatro procesos que son la fijación del N, la nitrificación, la desnitrificación y la mineralización del N (Ogunseitan 2005). El proceso de fijación de N atmosférico (reducción a formas asimilables) puede lograrse mediante métodos químicos y biológicos. La FBN consiste en la reducción del N atmosférico a la forma amonio y es realizado por la acción combinada del complejo enzimático nitrogenasa presente en algunos microorganismos denominados diazótrofos, enzima que opera a temperatura ambiente y a presión parcial de N de 0,78 atmósferas. Como consecuencia de este accionar biológico, el aporte de N es de aproximadamente 180-200 millones de toneladas por año, representando más del doble del N introducido por los fertilizantes nitrogenados (Vinuesa 1998). Los procesos industriales, como el de Haber-Bosch, representan menos del 30% de la fijación total mundial, mientras que otro 10% provendría de los procesos no biológicos realizados en la atmósfera. Es de suponer entonces que más de un 60% del total del N que se incorpora en el suelo y aguas procedería de la FBN (Frioni 1999).

Dentro de los microorganismos diazótrofos se encuentran los fijadores de vida libre, los cuales fijan N atmosférico sin la cooperación de otras formas vivas, siendo la familia Azotobacteriaceae la que agrupa uno de los géneros más importantes utilizados en la biofertilización de diferentes cultivos. Otro grupo de microorganismos fijadores de N son los rizobios, bacterias capaces de establecer relaciones simbióticas con plantas leguminosas (Sessitsch y col. 2002). La inoculación de leguminosas con rizobios altamente eficientes en reducir el N atmosférico a formas disponibles es una práctica habitual utilizada en agricultura (Catroux y col. 2001) y requiere de la supervivencia y establecimiento del rizobio introducido en la complejidad del ecosistema suelo.

1.3 Los rizobios

Actualmente se denomina rizobios a un grupo de 98 especies nucleados en 13 géneros, los cuales son: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Devosia*, *Ensifer* (formalmente *Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Methilobacterium*, *Microvirga*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium* y *Shinella* (<<http://www.rhizobia.co.nz>>), incluyendo α - o β -proteobacterias, comúnmente referidas como α - o β -rizobios (Masson-Boivin y col. 2009). Se caracterizan por ser bacilos Gram negativos de 0,5 a 0,9 μm de ancho y 1,2 a 3,0 μm de largo, no formadores de endosporas, móviles con un flagelo polar o bien con 2 a 6 flagelos peritricos, con presencia de gránulos de ácido poli-beta-hidroxibutírico (PHBA) y en algunos casos gránulos metacromáticos de polifosfatos. Son bacterias que presentan metabolismo aeróbico, quimiorganotrofo. En condiciones de laboratorio se obtiene un crecimiento óptimo de estos microorganismos a temperaturas comprendidas entre 25-30 °C, buena aireación y un rango de pH del medio de cultivo entre 6 y 7 (Somasegaran y Hoben 1994). Basándose en las propiedades culturales se diferencian dos grupos:

- Rizobios de crecimiento rápido, con tiempos de generación inferiores a 8 horas (Hernández y Focht 1984), que acidifican el medio y liberan abundante polisacárido (*Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium phaseoli*, *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*).

- Rizobios de crecimiento lento, con tiempos de generación que superan las 8 horas (Hernández y Focht 1984), que producen poco polisacárido y alcalinizan el medio (*Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium* sp.).

Diferentes tipos de estudios han detallado que los rizobios presentan tres estados de vida:

- 1- Como bacteroide dentro de los nódulos de las leguminosas siendo la forma diferenciada que fija N, carente de flagelos y que no se divide. Se caracteriza por presentar formas irregulares y se encuentra encerrado dentro de envolturas membranosas de origen vegetal (membranas peribacteroidales).
- 2- Como bacteria de vida libre en el suelo ya sea en estado planctónico o formando parte de un biofilm.
- 3- Como endófito dentro de plantas no leguminosas.

La característica fenotípica más sobresaliente de los rizobios es su capacidad de establecer una asociación simbiótica (intracelular) con las leguminosas, cuyo resultado es la formación de nódulos fijadores de N en las raíces de las mismas (Masson-Boivin y col. 2009).

1.4 Las leguminosas

Las leguminosas o Fabáceas constituyen la segunda familia en importancia agronómica para el hombre, detrás de las Gramíneas (familia Poaceae), y comprende una amplia variedad de especies vegetales, englobadas en 727 géneros y 19325 especies, que van desde pequeñas plantas herbáceas a grandes árboles tropicales (Veitch 2007). Pertenecen a la familia de las Fabáceas tres subfamilias: Mimosoideae, Caesalpinioideae y Papilionoideae, de las cuales el 97%, 23%, y 90% son noduladas por rizobios, respectivamente (Graham 2000; Sprent 2001). La subfamilia Papilionoidae incluye miembros de importancia agronómica como por ejemplo soja, arveja, maní, poroto, alfalfa y lotus.

Las leguminosas acceden al N atmosférico a través de la simbiosis que establecen con los rizobios y de esta manera requieren un mínimo uso de fertilizantes nitrogenados. Gracias a esta capacidad de establecer una simbiosis con los rizobios, presentan altos contenidos de compuestos nitrogenados tanto en materia verde como en granos, de aquí la importancia de las leguminosas para la utilización en nutrición humana y animal. Cuando parte de este N se torna disponible para un cultivo subsiguiente, el uso de las leguminosas en la rotación de cultivos puede conducir a reducir el uso de la fertilización nitrogenada en los ambientes agrícolas. Por otro lado, mejoran sensiblemente el mantenimiento de la vida útil del suelo, cuya fertilidad y estructura se ven favorecidas por la incorporación de rastrojos de estas especies (Del Papa 2001). Otros beneficios que no deben ser ignorados y que también aportan los cultivos de las leguminosas, son la reducida ocurrencia de plagas y malezas (Stevenson y van Kessel 1996; Unkovich y col. 1997). La mayoría de las especies presentan problemas de desarrollo y nodulación en suelos ácidos, con excepción de las especies tropicales que presentan elevada capacidad de extracción de nutrientes en estas condiciones (Frioni 1999).

1.5 Simbiosis rizobio-leguminosa

La simbiosis entre los rizobios y las leguminosas lleva a la formación de un nuevo órgano llamado nódulo. Dentro de esta estructura las bacterias se diferencian a bacteroides y fijan el N atmosférico a una forma asimilable por la planta con la que intercambia nutrientes. La organogénesis del nódulo es un proceso inducido por un intercambio de señales entre los dos socios de la interacción: el microsimbionte (bacteria) y el macrosimbionte (planta) (Downie y Walker 1999).

Las raíces de las leguminosas liberan en el medio una gran variedad de moléculas denominadas en conjunto rizodeposición que son causantes de que el espacio que rodea a la raíz (rizósfera) posea una diversidad microbiana impactante (Somers y col. 2004). Dentro de la quimio-diversidad de moléculas liberadas por las raíces se encuentran los flavonoides que en condiciones de limitación de N juegan un rol importante debido a que se constituyen en la primera señal en ser reconocida por el rizobio específico (Mergaert y col. 1997). La respuesta de los rizobios a los flavonoides incluye la quimiotaxis hacia la superficie radical, la adhesión a la misma y la expresión de los genes de nodulación bacterianos (genes *nod*). Los productos de los genes *nod* sintetizan y secretan moléculas conocidas como factores de la nodulación (factores Nod), los cuales generan distintos eventos durante las etapas iniciales del desarrollo del nódulo como la curvatura de los pelos radicales, la división de las células meristemáticas (Hirsch 1992) y la expresión de varios genes tempranos de la nodulación (genes *ENOD*) (Hirsch y col. 1997). Estos sucesos permiten la penetración a la raíz de las bacterias adheridas a los pelos radiculares a través de una estructura tubular llamada hilo de infección (Kijne 1992). Este se extiende hacia la corteza radicular y cuando alcanza el primordio nodular, las bacterias son liberadas en el citoplasma de la planta, donde se diferencian a su forma endosimbiótica, los bacteroides.

Mayoritariamente la infección de las leguminosas por los rizobios se asocia a este mecanismo (pelos radicales y formación de hilos de infección). En otros casos, los rizobios tienen la capacidad de penetrar de manera activa el sistema radicular por la liberación de enzimas como celulasas y poligalacturonasas las cuales le permiten generar lesiones en la epidermis en el lugar de emergencia de raíces laterales, mecanismo conocido con el nombre de “*crack entry*” (Compant y col. 2009), que tiene lugar en maní (Boogerd y van Rossum 1997). La invasión intercelular de los rizobios en maní ocurre mediante la separación de células corticales a nivel de la laminilla media con la posterior segregación

de fitohormonas como citoquininas y auxinas por las bacterias, lo que induce una proliferación de las células de la corteza. Sólo después de que las células de *A. hypogaea* cesan de dividirse, los rizobios en forma de bacilos se diferencian a bacteroides esféricos estrechamente dispuestos en el citoplasma vegetal e individualmente encerrados en sacos de membrana peribacteroidal (Sen y col. 1986). A continuación se reprimen los genes de vida libre para la posterior expresión de los genes que permiten la FBN y los involucrados en la formación del complejo enzimático nitrogenasa. A pesar de que es referenciado que un tipo de invasión rizobiana mixta (por hilos de infección y penetración intercelular) ocurre en varias leguminosas tropicales, en maní no han sido observadas estructuras semejantes a los hilos de infección (Boogerd y van Rossum 1997).

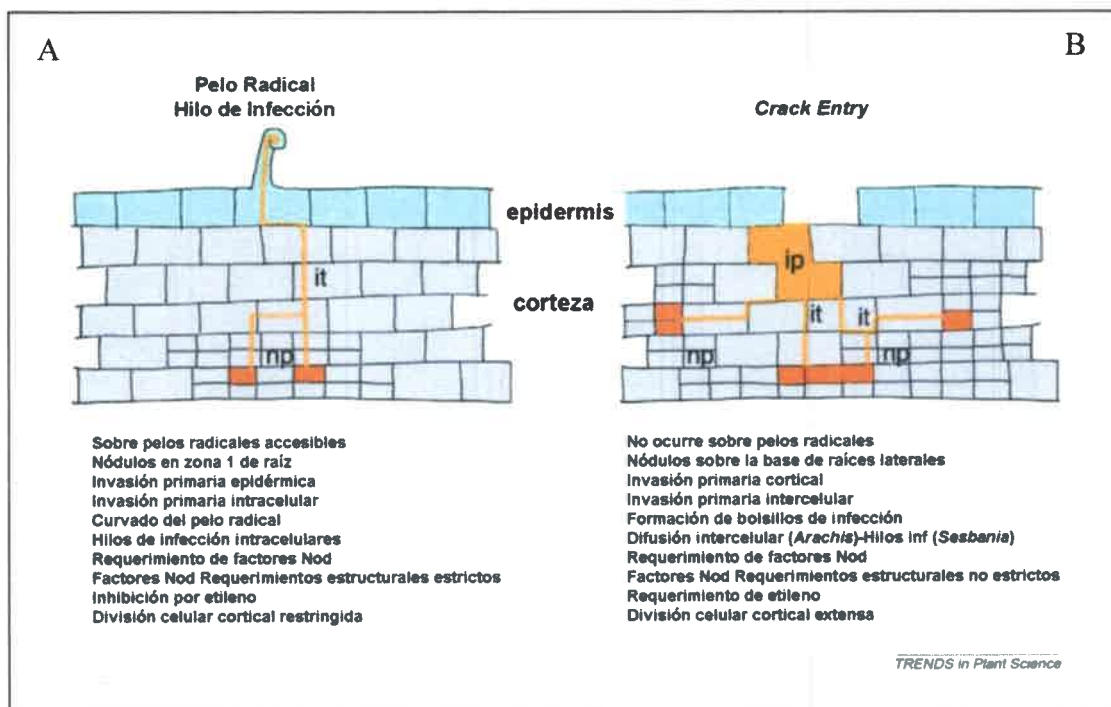


Figura 1: Mecanismos de infección de las leguminosas. **(A)** Mecanismo de infección intracelular mediado por hilos de infección (it). Los hilos de infección progresan hacia los primordios nodulares (np) donde las células vegetales reciben a las bacterias. **(B)** Mecanismo de *crack entry*. Las bacterias colonizan los espacios intercelulares (ip) y se diseminan intercelularmente o por hilos de infección para alcanzar los primordios nodulares. Fuente: Trends in Plant Sciences, Goormachtig y col. 2004.

Un dato de gran relevancia es que tanto el N fijado biológicamente por el cultivo de maní así como por otras leguminosas, es asimilado en su totalidad por la planta de estas especies incorporándose a sus compuestos celulares. Esta es la causa de que se investiguen especies vegetales de importancia alimenticia independientes del empleo de fertilizantes nitrogenados, ya que el uso de éstos compuestos químicos afectan el ciclo global del N,

contaminan las napas freáticas, aumentan el contenido de óxido nitroso atmosférico (N_2O , gas con efecto invernadero) y el cultivo no lo incorpora en su totalidad, por lo que su uso no es una opción recomendable. Por otro lado, la aplicación de fertilizantes nitrogenados para aumentar los rendimientos inhibe el establecimiento de la simbiosis efectiva y, en consecuencia, el aprovechamiento del N atmosférico. Por el contrario, la utilización de inoculantes a base de rizobios dirigidos a prevenir la deficiencia de N para estos cultivos resulta más conveniente y económico que la fertilización química y evita además la contaminación ambiental.

La necesidad de N en una planta aumenta progresivamente a medida que entra en su fase exponencial de crecimiento y la demanda de dicho elemento supera a la tasa de suministro desde el suelo. Las leguminosas pueden fijar 100-200 kg de N por ha por año, pero las tasas son a menudo sustancialmente más bajas, y en los últimos 25 años, la soja y otras leguminosas han mostrado en algunos casos una disminución significativa de la FBN. Para investigar las causas que pueden tener injerencia en la reducción de la FBN, Fox y col. (2001) evaluaron el impacto de 30 diferentes plaguicidas y contaminantes ambientales sobre dicho proceso biológico, demostrando que específicamente estos compuestos perturbaron la señalización simbiótica entre flavonoides y receptores Nod D de *Sinorhizobium meliloti*. Trabajos posteriores demostraron que plaguicidas organoclorados y otros contaminantes inhiben la señalización simbiótica entre la alfalfa y *S. meliloti*, retrasando la nodulación, reduciendo la FBN y en consecuencia disminuyendo la producción de alfalfa (Fox y col. 2007). Un punto clave de acción de los compuestos químicos de amplio uso en la producción agrícola, es sobre las membranas biológicas, tanto de las células vegetales como de las bacterias. Diversos estudios se han orientado a determinar la interacción de compuestos del tipo de pesticidas con las bicapas lipídicas (Antunes-Madeira y col. 1996). Varios compuestos químicos han mostrado capacidad de inducir perturbaciones en las cadenas carbonadas y regiones polares de los lípidos (Videira y col. 1994). Sin embargo a pesar de la gran importancia que tiene la aplicación de compuestos químicos del tipo de herbicidas, insecticidas, entre otros, para la producción de cultivos de importancia agrícola, escasos son los estudios referidos a evaluar la supervivencia y efectividad que los rizobios tienen frente a la presencia de estos productos industriales.

1.6 *Arachis hypogaea*: leguminosa de importancia regional

El maní es un cultivo subtropical que se desarrolla óptimamente entre los 40°N y 40°S del Ecuador debido a que tiene una alta necesidad de irradiación. Crece en regiones con una precipitación anual media de 500 a 1200 milímetros (mm) y prospera mejor cuando recibe 550 mm de lluvia de manera uniforme durante el período de crecimiento y necesita suelos bien drenados con alto porcentaje de arena. Se produce y se comercializa como materia prima de la industria aceitera, maní industria (producción de aceite y pellets de esta oleaginosa) y para consumo humano directo como maní confitería. El producto más valioso de la industrialización del maní es el aceite, tanto por el contenido de materia grasa de la semilla (alrededor del 40%), como por la calidad del mismo. Entre todos los aceites comestibles es el que mejor se cotiza luego del aceite de oliva (CAM, 2008).

El maní pertenece a la familia Leguminosae, subfamilia Papilionoideae y género *Arachis* (Lavin y col. 2001; Doyle y Luckow 2003). El género *Arachis* ha sido dividido en 2 subespecies y 6 variedades, donde la única especie con importancia económica es *A. hypogaea* L., conocida como maní o cacahuete, siendo la semilla la parte de mayor interés comercial. *A. hypogaea* incluye los tipos botánicos Virginia, Español y Valencia. Dentro de estos, el Virginia runner es el sembrado actualmente en Argentina y algunas variedades emergentes que surgieron del cruzamiento entre los tipos Virginia y Español, caracterizados por semillas de gran tamaño. Las plantas de maní son anuales con un crecimiento indeterminado y los granos son utilizados como fuente de materia prima para las industrias aceiteras y de confitería, además de su exportación, como producto primario o elaborado (Cholaky y col. 1983). La parte aérea también es empleada como alimento para cerdos y ganado, incluso un producto residual como lo es la cáscara está siendo empleada en emprendimientos comerciales (Gatani y Argüello 2005).

A. hypogaea L. es una planta anual herbácea de 15-70 centímetro (cm) de alto, con ramificaciones desde la base, que desarrolla raíces cuando dichas ramas tocan el suelo. Las hojas son uniformemente pinadas con 2 pares de folíolos de 4-8 cm de largo, obtusos, o ligeramente puntiagudos en el ápice, con márgenes completos; las estípulas son lineares puntiagudas, grandes, prominentes, y llegan hasta la base del pecíolo. Las flores son ostentosas, sésiles en un principio y con tallos que nacen posteriormente en unas cuantas inflorescencias cortas, densas y axilares. El tubo del cáliz es de forma tubular y las corolas son de color amarillo brillante y el estándar que es de tamaño grande frecuentemente presenta manchas moradas. Después de que las flores han sido fertilizadas, el pedicelo

verdadero se desarrolla en un tallo o estaquilla que gradualmente empuja el ovario dentro del suelo. Las vainas se encuentran enterradas a 3-10 cm debajo de la superficie. Son de 1-7 cm de largo, abultadas en su interior, y con 1 a 4 semillas, de color café amarillento, con bordes prominentes reticulados y más o menos deprimidos entre las semillas. La testa es de color rojo claro o rojo oscuro (Stalker 1997). Se reconocen dos grupos principales de variedades, las de planta erecta (de interés comercial) y las de tipo rastrero.

Las características anteriormente mencionadas de *A. hypogaea* se encuentran esquematizadas en la figura 2.



Figura 2: Características botánicas relacionadas a *A. hypogaea*

1.7 Simbiosis *Bradyrhizobium* sp.- *Arachis hypogaea*

Esta leguminosa se caracteriza por ser ampliamente nodulada por rizobios de crecimiento lento pertenecientes al género *Bradyrhizobium* sp., aunque también se ha descrito la nodulación de maní por cepas de rizobio de crecimiento rápido (Taurian 2003).

En maní, como en otras leguminosas pertenecientes al clado Dalbergioid (Lavin y col. 2001), el mecanismo de infección de los rizobios difiere de otras leguminosas herbáceas. El género *Bradyrhizobium* que nodula las plantas de *A. hypogaea* inducen a la deformación de los pelos radicales que se encuentran únicamente localizados en los sitios donde emergen las raíces laterales. Sin embargo, el sitio real de infección está en el empalme de una célula del pelo radical con células epidérmicas y corticales. Dentro de las células corticales se multiplican rápidamente y las células invadidas se dividen rápidamente para formar un nódulo definido (Boogerd y van Rossum 1997) Por otra parte, la anatomía del nódulo y la habilidad superior de fijar N colocaron los nódulos del maní en una categoría separada entre las diferentes relaciones simbióticas de leguminosas-rizobios (Bal y col. 1989). En los nódulos de maní los rizobios sufren modificaciones convirtiéndose en bacteroides ampliados sumamente esféricos (Bal y col. 1985) y contienen cuerpos lipídicos que están en contacto cercano con la membrana del peribacteroide (Bal 1990; Siddique y Bal 1991). Varios de los procesos que son esenciales en el hilo de infección no ocurren en el proceso de *crack entry* y comprender este mecanismo permitiría desarrollar estrategias para optimizar la nodulación en plantas de interés agronómico (Sprenst y de Faría 1988; Boogerd y van Rossum 1997).

Actualmente el maní es cultivado en diferentes regiones del mundo. La producción mundial estimada es de 35,98 millones de toneladas. De acuerdo al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), China lidera la producción de maní teniendo un 37,5% de la producción total, seguido por India, Estados Unidos, Argentina y Vietnam. En Argentina un 87% de la producción de maní tiene lugar en la Provincia de Córdoba, siendo el maní obtenido de gran calidad y casi toda la producción es exportada a la Unión Europea, Indonesia y Canadá (SAGPyA 2008). En la campaña agrícola 2012/2013, el maní alcanzó las 264.00 ha sembradas, con una producción de 594.000 toneladas según las estimaciones de la Unidad Ministerial del Sistema Integrado de Información Agropecuaria (UMSIIA 2013). La estimación de la superficie sembrada con maní en Argentina en el ciclo 2014 - 2015 es de 349.407 ha (www.camaradelmani.com.ar), esto refuerza aún más los desafíos científicos a futuro que permitan su agricultura sustentable y respetuosa del medio ambiente (Adreani 2009). Este cultivo constituye una de las principales economías regionales ya que emplea en la provincia de Córdoba a unas 12 mil personas en forma directa, existiendo unas 26 plantas procesadoras (www.camaradelmani.com.ar), entre las cuales se encuentran cooperativas, empresas de capitales nacionales e internacionales y

esta actividad contribuye al sostén económico de numerosos pueblos del interior de la provincia (SAGPyA 2004). Debido al potencial productivo existente y a la baja demanda de consumo interno, el maní es un producto que se siembra principalmente para exportar y así nuestro país se ha transformado en el primer exportador mundial de maní, desplazando a China, India y Estados Unidos (www.camaradelmani.com.ar).

1.8 Inoculación

1.8.1 Objetivos, ventajas y dificultades de la inoculación

El objetivo de la inoculación es proveer un número suficiente de rizobios viables para inducir la rápida colonización de la rizosfera de modo tal que la nodulación ocurra luego de la germinación y produzca óptimos rendimientos (Catroux y col. 2001).

La inoculación de semillas de leguminosas es un eficiente y conveniente modo de introducir rizobios viables al suelo (Deaker y col. 2004). Sin embargo, la población de rizobios nativos establecida interfiere con la cepa introducida creando una barrera competitiva que puede causar el fracaso de la inoculación (Thies y col. 1991b). Ha sido estimado que un número tan bajo como 10 células por gramo (g) de suelo son suficientes para la formación de nódulos en la leguminosa (Streeter 1994). El éxito de los inoculantes depende de un número de factores interrelacionados determinados por el genoma bacteriano, el genoma de la planta y el ambiente (Sturz y col. 2000). Los inoculantes bacterianos deben ser buenos noduladores, fijadores efectivos y capaces de competir con las bacterias nativas menos eficientes (Cattelan y col. 1999).

La efectividad simbiótica de los rizobios nativos suele ser reducida por la adaptación de estas bacterias a las condiciones agroclimáticas (factores ambientales, aplicación de fungicidas y pesticidas) (Zahran 1999), determinando que los rizobios residentes en los suelos, se constituyan como poblaciones con alta capacidad competitiva y de supervivencia pero con baja eficiencia simbiótica. Por otro lado, los rizobios inoculados persisten en el suelo dando lugar a poblaciones naturalizadas con baja eficiencia simbiótica debido a transferencia horizontal de genes entre miembros de la población (Provorov y Vorobyob 2000).

En virtud de estas consideraciones, la exitosa nodulación de leguminosas por una cepa introducida está determinada por la habilidad competitiva de esa cepa contra las nativas presentes en el suelo (Moawad y Bohlool 1984).

1.8.2 Supervivencia y competitividad de cepas inoculadas

La capacidad de fijación de N ha sido utilizada como el criterio más importante en la selección de una cepa para la producción de inoculantes. Sin embargo, para que la cepa inoculada tenga el efecto deseado sobre el rendimiento de un cultivo, debe ser capaz de sobrevivir y competir en el suelo con las cepas residentes del mismo. De este modo, es trascendental identificar cepas altamente efectivas pero que también sean competitivas *in situ* (Moawadt y Bohlool 1984). La supervivencia, persistencia y habilidad competitiva de la cepa inoculada limita su éxito en el suelo (Dowling y Broughton 1986; Lakshminarayana y Sharma 1994).

Se denomina competitividad a la habilidad de ciertas cepas de *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* de dominar la nodulación de raíces de leguminosas en presencia de otras cepas (Bhagwat y col. 1991).

Varios fenotipos o factores rizobianos que no son necesarios para el establecimiento de la simbiosis se han identificado teniendo importantes roles en la competitividad por la nodulación (Triplett y Sadowsky 1992; Toro 1996). Estos factores incluyen antibiosis (Triplett y Barta 1987), movilidad (Liu y col. 1989), rizopinas (Gordon y col. 1996), velocidad y eficiencia de nodulación, características superficiales (Sturz y col. 2000), producción de exopolisacáridos (McDermott y Graham 1989) y catabolismo de prolina (van Dillewijn y col. 2001) y producción de rizobitoxina (Okazaki y col. 2003).

En las especies de *Bradyrhizobium*, de crecimiento lento, la competitividad está relacionada primariamente con características serológicas y localización geográfica de las cepas nativas (Kosslak y Bohlool 1985; Sadowsky y col. 1987).

Rhizobium y *Bradyrhizobium* producen diferentes polisacáridos como exopolisacáridos (EPS), polisacáridos capsulares (CPS), lipopolisacáridos (LPS) y glucanos cíclicos, los cuales participan de la interacción simbiótica. Se ha postulado que tales compuestos, pueden estar involucrados en la competencia por la nodulación (Bhagwat y col. 1991). En consonancia con esta observación, es probable que la capacidad de formación de biofilm esté vinculada a una mayor competitividad o supervivencia en el suelo.

La habilidad competitiva de un inoculante es reconocida como una propiedad importante del mismo (Brockwell y col. 1982). La respuesta de la planta a la inoculación es dependiente de varios factores ambientales y genéticos (Thies y col. 1991a; Triplett y



Sadowsky 1992), por lo tanto, la habilidad de cada cepa debería ser evaluada en condiciones agrícolas específicas (Tas y col. 1996).

Se conocen factores bióticos y ambientales que afectan directa o indirectamente la competitividad de las cepas inoculadas. Dentro de los factores ambientales se encuentran las características del suelo, pH, salinidad, potencial acuoso y temperatura (Bottomley 1992). Los factores bióticos que influyen son antagonismo microbiano, predación y parasitismo (Dowling y Broughton 1986).

1.8.3 Implicancia en la selección de cepas para inoculantes

Típicamente, la selección de cepas para su uso como inoculantes ha involucrado el muestreo y caracterización de una determinada cantidad de cepas en función de su performance simbiótica bajo condiciones controladas previo a corroborar su persistencia en el ambiente (Howieson y col. 2000). Una alternativa con mayor alcance es la selección de cepas aisladas de campo que constituyen la mayor proporción de los nódulos de una leguminosa determinada en ese ambiente en particular y comprobar en estas cepas las propiedades simbióticas y de competitividad (Denton y col. 2002). No obstante, ha sido demostrado que las cepas dominantes en el suelo pueden manifestar una baja competitividad en ensayos de laboratorio (McLoughlin y Dunican 1985; Leung y col 1994).

La selección de rizobios competitivos y bien adaptados a los distintos ambientes o la selección de leguminosas capaces de nodular con una amplia variedad de rizobios, son posiblemente los métodos más simples de mejorar la fijación de N en suelos con diferentes características (Denton y col. 2003).

1.8.4 Influencia del método de inoculación

La competencia por la nodulación es un fenómeno complejo y pobremente entendido, donde además de diferencias genéticas y fisiológicas entre la cepa inoculada y las establecidas, el efecto posicional parece ser crucial si comparamos los rizobios nativos ampliamente distribuidos por el perfil edáfico en relación a la cepa inoculada que permanece concentrada alrededor de la semilla (López-García y col. 2002). Los nódulos formados sobre raíces laterales por debajo de los cinco centímetros del suelo, se constituyen más tarde que aquellos que lo hacen cerca del cuello de la raíz principal y han

sido implicados en la fijación de N en las últimas etapas de un cultivo (Hardarson y col. 1989; McDermott y Graham 1989), tiempo en el cual los nódulos de la raíz principal pueden estar senescentes. De esta manera, si las cepas de interés son inoculadas en la semilla, están restringidas a los primeros centímetros del sistema radical y la fijación de N en el periodo de llenado de granos puede estar significativamente reducida si depende de los nódulos en las secciones bajas de la raíz formados por cepas nativas de pobre eficiencia simbiótica (Denton y col. 2003).

La inoculación en semilla resulta en baja ocupancia de nódulos con la cepa inoculada debido a su pobre movilidad y a la amplia distribución de rizobios nativos en el perfil del suelo que les permite formar nódulos sobre la totalidad del sistema radical (Weaver y Frederick 1974).

El comportamiento rizobiano en la rizósfera determina la capacidad de nodulación y la efectividad de fijación, el desarrollo de un sistema simbiótico pleno debe lograrse incrementando el número de rizobios efectivos a través tecnologías de inoculación mejoradas (Thies y col. 1991b). La inoculación directa del suelo previo a la siembra, denominada inoculación en surco, presenta ciertas ventajas en relación a la inoculación en semilla, ya que ubica células viables en el perfil del suelo permitiendo una mejor infección del sistema radical de la leguminosa, evita el daño que sufre el tegumento de la semilla durante el peleteo y supera los efectos adversos que los fungicidas y pesticidas aplicados sobre la semilla tienen sobre los rizobios (Fouilleux y col. 1994). Particularmente, los fungicidas son productos químicos de uso muy difundido y están compuestos por una o varias sustancias que se utilizan sobre la semilla para protegerla de la acción de distintos microorganismos patógenos, fundamentalmente hongos. Estos productos presentan distintos grados de letalidad sobre los rizobios inoculados en la semilla (Hashem y col. 1997).

Bogino y col. (2011), evaluaron el rendimiento de la inoculación en semilla y surco de la cepa bradyrizobio C145 sobre maní. Los resultados, obtenidos de los ensayos en el campo, demostraron que la inoculación en surco produjo un mayor número y peso de nódulos. Las diferencias en el número de bacteroides y contenido de leghemoglobina por planta o por nódulo no fueron estadísticamente significativas. La actividad nitrogenasa fue mayor en la inoculación en surco cuando se determinó el parámetro en los nódulos de la raíz entera.

Un aspecto a considerar cuando se comparan ambos métodos de inoculación, es que la dosis empleada para realizar inoculación en surco es aproximadamente unas 6 veces superior que la requerida para inocular en semilla, lo cual, aunque provee de un mayor número de rizobios, significa un costo económico superior.

1.8.5 Inoculación de maní

En líneas generales, la inoculación de maní ha arrojado resultados controversiales y es una práctica agrícola discutida. Michelena y col. (1996) demostraron que con la aplicación de la cepa apropiada de rizobio, el maní es capaz de producir un mayor rendimiento de frutos con un alto contenido de proteínas. Esto se refiere a la capacidad relativa de cepas particulares para ocupar nódulos en las plantas hospedadoras en presencia de otras simbioses.

Los suelos de la zona manisera de Córdoba se caracterizan por presentar una población nativa de rizobios capaces de nodular maní, la cual no siempre es lo suficientemente efectiva. Estos simbioses nativos pueden estar limitados por factores ambientales, por la tecnología de producción, o por los efectos de micotoxinas producidas por algunos hongos del suelo, entre otros factores (Fabra y col. 2010). La complejidad de esta práctica agrícola sumado a los escasos datos referidos a la simbiosis rizobio-maní, particularmente a los eventos tempranos de interacción, otorgan a todos aquellos nuevos abordajes de caracterización de esta simbiosis una gran importancia por ser generadores de conocimientos novedosos para optimizar el empleo de biofertilizantes que permitan una agricultura sustentable del maní.

La optimización en el proceso de fijación del N debería alcanzarse con la utilización de una cepa acorde al hospedador lo cual se logra con estudios asociados a su capacidad de colonizar, de competencia, de eficiencia en la fijación, entre otras características. El establecimiento y la persistencia de una cepa más efectiva inoculada en el ecosistema de la leguminosa está condicionada por microorganismos nativos del suelo, debido a que son miembros adaptados a ese ambiente y a diferentes factores que afectan directa o indirectamente la competitividad de las cepas inoculadas (Bottomley 1992). Los factores bióticos que influyen son por ejemplo antagonismo microbiano y parasitismo (Dowling y Broughton 1986). Si bien la población nativa, adaptada a las características edafoclimáticas de la región centro sur de Córdoba puede proporcionar cepas eficientes para la inoculación, es difícil encontrar una bacteria que sobreviva a las distintas

condiciones ambientales y en las diferentes regiones de siembra que actualmente tiene el maní en Argentina. Por ello, es necesario realizar para las variadas áreas de cultivo estudios de diversidad microbiana de simbiontes de maní, de interacción y FBN para seleccionar microorganismos que puedan ser utilizados como inoculantes de interés agronómico para aplicar en las mismas. Esto sumado a las buenas prácticas de manejo del cultivo y la mejora en el procesamiento industrial del maní, favorecería la calidad del maní argentino.

1.9 Papel de la movilidad bacteriana y su importancia en el suelo

La movilidad es una característica de los rizobios que puede contribuir en el éxito de la competitividad simbiótica de estas bacterias (Ames y Bergman 1981). Henrichsen (1972) ha identificado seis categorías de movilidad bacteriana: swimming, swarming, twitching, gliding, sliding y darting. Swimming y swarming están correlacionados con la presencia de flagelos, mientras que tanto el twitching como diferentes formas de gliding dependen del pilis tipo IV (Mattick 2002). El sliding es una forma de translocación pasiva (Martínez y col. 1999) y el darting no ha sido ampliamente referenciado (Harshey 2003).

El swimming es uno de los movimientos de mayor importancia en el suelo, el cuál ha sido estudiado mayormente en medio líquido. Sin embargo, esta forma de movilidad puede también ocurrir cuando la bacteria coloniza un medio de cultivo con baja concentración de agar (0,2 - 0,4%).

En contraste al movimiento bacteriano individual que ocurre en el swimming, el swarming es considerado un comportamiento bacteriano grupal asociado con una migración en superficie semisólida (Williams y Schwarzhoff 1978). Un mayor número de flagelos son requeridos para el swarming lo cual puede deberse a una mayor fricción de la colonia con el medio (Harshey 2003). El fenómeno de swarming ha sido demostrado en diversas bacterias incluyendo miembros de *Aeromonas*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, etc. (Daniels y col. 2004). Cuando las células son inoculadas en la superficie de un medio agar, se forman colonias regulares en el punto de inoculación. Luego las células inician un proceso de diferenciación en células largas multinucleadas e hiper flageladas llamadas células swarm (Breaken y col. 2007) que desarrollan ciclos de migración de la población, rápidos y coordinados a través de la superficie sólida. El rápido movimiento de las células swarm en el borde de las colonias es

acompañado por un crecimiento bacteriano dentro de la misma, resultando en una pronta colonización de la superficie disponible (Sharma y Anand 2002).

Todos los organismos que realizan swarming poseen flagelos peritricos y también las células vegetativas pueden tener flagelos peritricos polares o numerosos flagelos laterales (Allison y Hughes 1991). Hay tres etapas bien definidas del swarming y estas incluyen:

1. Diferenciación de las células vegetativas en células swarm: Cuando las células son inoculadas en la superficie del agar, colonias regulares se forman inicialmente. Luego células en la periferia o borde de las colonias, se diferencian en células largas multinucleadas e hiper flageladas, por la producción de flagelos y la represión de la septación de las células (Allison y Hughes 1991; Eberl y col. 1999).
2. Migración de la población de células swarm: Este proceso involucra el movimiento de células swarm elongadas altamente flageladas como grupos en la superficie del agar. Adicionalmente el contacto célula-célula es esencial para este tipo de migración. Esto es respaldado por el hecho de que las células swarm individuales son incapaces de moverse a través de la superficie del agar sólido (Eberl y col. 1999).
3. Consolidación: Luego de un periodo de migración, las células swarm revierten a células vegetativas, las cuales son capaces de reiniciar ciclos de diferenciación en células que realizan swarming dando zonas concéntricas en la superficie del agar (Williams y Schwarzhoff 1978; Allison y Hughes 1991).

Este fenómeno colectivo representa una ventaja sobre las células individuales, permitiendo que las bacterias se muevan hacia las fuentes de nutrición para alejarse de potenciales causas dañinas (Wei y col. 2011) (Macfarlane y col. 2001; Zhdankin y Sprott, 2010), para protegerse de la acción de los antibióticos (Overhage y col. 2008; Butler y col. 2010), para evitar la competencia (Taylor y Buckling 2010) y de influir en otras características de virulencia relacionadas, tales como la formación de biofilm (Blair y col. 2008) y la colonización de hospedadores (Ghelardi y col. 2007).

Se considera que las respuestas de quimiotaxis y movilidad afectan el movimiento de las bacterias en el suelo (Soby y Bergman 1983), la adhesión a las raíces de los hospedadores (Caetano-Anollés y col. 1988) y la colonización de la superficie de las raíces (Caetano-Anollés y col. 1992). La inducción de los genes *nod* está directamente asociada a



los eventos de infección temprano. Ha sido reportado que los rizobios responden rápidamente a sustancias quimioattractantes y que los genes *nod* son inducidos unos minutos más tarde (Zaat y col. 1987). Kato y Arima (2006) reportaron que los exudados de semillas de poroto presentaron un mayor potencial de promoción para la proliferación de *Rhizobium* que los exudados de raíz y que células inoculadas de *Rhizobium* proliferaron considerablemente alrededor de las semillas de poroto bajo condiciones asépticas. Este efecto de promoción del crecimiento está dado por grandes cantidades de azúcares y aminoácidos existentes en los exudados de semilla (Kato y col. 2005). La presencia de químicos causa que las bacterias se muevan preferentemente hacia concentraciones crecientes de los quimioattractantes y se alejen de sustancias químicas desfavorables llamados quimiorepelentes. En este fenómeno, llamado quimiotaxis, las bacterias detectan los estímulos quimiotácticos en el entorno a través de los quimiorreceptores situados en su espacio periplásmico o membrana interna y las señales se transmiten a los flagelos, los cuales giran como las agujas del reloj o en sentido contrario (Koshland 1980). La quimiotaxis, como fenómeno biológico se lo ha encontrado en múltiples procesos biológicos como desarrollo de biofilm (Gristina 1987), infección de patógenos (Freter y col. 1979) fijación del N (Pearl y Gallucci 1985), migración en aguas subterráneas y suelos como así también en la bioremediación in situ (Gannon y col. 1991).

Ante estos y otros reportes bibliográficos, no es utópico pensar que si las bacterias en medios de cultivo muestran estos tipos de comportamientos, el suelo, la rizósfera y la superficie de la raíz se tornan en ambientes con una alta capacidad para poner de manifiesto cualquier tipo de movilidad bacteriana que le permitan colonizar, competir y porque no fijar mejor el N biológicamente.

1.10 Efecto de agroquímicos sobre la viabilidad y la composición de ácidos grasos de membrana de rizobios simbioses de maní

En los últimos tiempos, el progreso industrial para optimizar la producción de alimentos ha llevado a la aplicación de diversos productos agroquímicos como fertilizantes, pesticidas, acondicionadores del suelo, fitohormonas, entre otros. Una fracción importante de estos productos fitosanitarios, especialmente los pesticidas, se acumulan en el suelo debido a su frecuente aplicación y en consecuencia, afectan adversamente las actividades metabólicas de la microflora del suelo que lleva finalmente a la pérdida de fertilidad del suelo (Ahemad y col. 2009). Por lo tanto, la comprensión de los

efectos tóxicos de los productos químicos sobre los rizobios y la fijación simbiótica de N es importante con el fin de revertir los posibles daños causados por la aplicación de los mismos. Wani y col. (2005) reportaron que el insecticida Forato (dosis entre 100 y 500 $\mu\text{g/ml}$) reduce la producción de ácido indol acético mediada por bacterias solubilizadoras de fosfato pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Serratia* aisladas a partir de diversos suelos rizosféricos. Dunfield y col. (2000) evaluaron los efectos de Captan y Tiram (fungicidas, dosis de 0,25 a 2 g/kg de semilla) sobre la supervivencia y las características fenotípicas de bacterias del género *Rhizobium leguminosarum* bv. viceae cepa C1; observaron reducción significativa el número de rizobios, recuperados a partir de semillas, pero sin embargo, sólo las concentraciones más altas de Captan afectaron la nodulación y el crecimiento de las leguminosas. El contacto con algunos fungicidas de aplicación sobre semilla, también podría generar cambios significativos sobre las características fenotípicas de los rizobios (Ahemad y Khan 2011).

Las bacterias pueden censar estímulos ambientales o la presencia de rizodeposiciones de las raíces y transmitir esas señales al motor flagelar a través de una vía de transducción de señales que controla la dirección y/o velocidad de la rotación del flagelo (Wadhams y Armitage 2004). Esto implica que procesos de movilidad bacteriana pueden estar condicionados a la capacidad de detectar señales externas. Para ello las funciones de la membrana plasmática se tornan relevantes, fundamentalmente su capacidad de actuar como barrera semipermeable para regular el paso de solutos entre la célula y el medio ambiente externo. Ibekwe y col. (2001) demostraron el impacto que los fungicidas tenían sobre las poblaciones microbianas y mostraron cambios en el perfil de ácidos grasos (AG) componentes de fosfolípidos (PL), destacando la importancia del estudio del comportamiento y supervivencia que los microorganismos podrían tener frente a compuestos xenobióticos luego de su aplicación. Medeot y col. (2010) han demostrado la importancia que existe entre la movilidad y una correcta composición de lípidos de membrana, ya que modificaciones en la misma conlleva a un menor tamaño celular y una reducida movilidad bacteriana. Todo esto puede implicar que en el suelo los lípidos de las membranas de los rizobios frente a factores químicos pueden tener un papel vital.

El avance de las técnicas moleculares del estudio de lípidos ha evidenciado que la membrana es un mosaico compuesto por numerosos dominios lipídicos específicamente situados y con funciones determinadas (Matsumoto 2001). La flexibilidad y la capacidad de adaptación de la membrana determinan en gran medida la capacidad de supervivencia

de las bacterias (Sajbidor 1997). Son muchos los factores externos, como la temperatura, pH, actividad de agua, nutrientes, iones, fase de crecimiento, entre otros, que afectan a las propiedades físico-químicas de la membrana y posteriormente su funcionamiento. La fluidez es uno de los parámetros más importantes de la membrana citoplasmática, que permite mantener la homeostasis de la célula y por lo tanto debe mantenerse dentro de ciertos valores estrictos para asegurar la funcionalidad de la misma. Los mecanismos de adaptación estudiados hasta el momento y que implican la modificación de los PL pueden incluir: I) cambios en el grado de insaturación de los AG, II) formación de AG ciclopropanos, III) isomerización de *cis* a *trans* de los AG insaturados y IV) modificación de los grupos cabeza de los PL (Hartig y col. 2005). En las diferentes familias de rizobios, el perfil de AG ha sido utilizado con fines quimiotaxonómicos (Tighe y col. 2000), sin embargo además de los efectos en la composición de AG debidos a la fase de crecimiento (Hubac y col. 1992; Boumahdi y col. 1999 y 2001) y bajas temperaturas (Drouin y col. 2000), no existe información sobre la respuesta de los rizobios a la presencia de fungicidas. Por ejemplo, ha sido informado en *E. coli* que la presencia de diferentes fungicidas afectaron principalmente el grado de insaturación de los AG componentes (Rosas y col. 1980). En otro estudio ha sido informado que el tratamiento de suelos con los fungicidas Captan, Chlorothalonil y Carbendazim provocó un aumento de AG ciclopropano en la flora microbiana del suelo (Ahemad y Khan 2011).

CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

La manipulación exitosa de la fuente de N a través del uso de su fijación biológica, resulta en prácticas agrícolas que son económicamente viables y ambientalmente prudentes. La simbiosis entre las especies bacterianas fijadoras de N, englobadas bajo el término de rizobios, y las leguminosas es crucial para una alta productividad de estos cultivos de gran importancia socio-económica. Un problema en estas prácticas concierne a la eficacia de los inoculantes de rizobios para la formación de las estructuras fijadoras de N (nódulos) en los cultivos de leguminosas. Más específicamente, el problema de la competitividad y la supervivencia del rizobio en el suelo, la tolerancia a las condiciones ambientales o la compatibilidad con otras cepas rizosféricas, dificultan el establecimiento de una simbiosis efectiva entre la leguminosa y el rizobio inoculado. Parte de estas dificultades, podrían revertirse con un estudio que aborde en forma integral la interacción entre rizobios y leguminosas.

La hipótesis planteada en esta Tesis Doctoral es que la aplicación adecuada de cepas biofertilizantes bajo una correcta labranza de los cultivos, produce cambios en la morfología de la planta que se ponen de manifiesto de diferentes maneras, como por ejemplo un mayor desarrollo radicular, una mayor producción de materia vegetal y lo que es más importante, una mayor producción de granos.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo general

El objetivo general del presente proyecto apunta, por un lado, a evaluar en qué medida el desarrollo de diferentes estrategias de biofertilización pueden favorecer la competitividad y la supervivencia de la cepa introducida en suelos con poblaciones microbianas nativas y, por otro lado, a determinar el impacto final sobre el rendimiento a cosecha de los cultivos.

2.2.2 Objetivos específicos

1- Estudiar la respuesta de la planta frente a distintas estrategias de biofertilización tales como la inoculación en semilla o en el surco de siembra. Cepas seleccionadas de *Bradyrhizobium* inoculadas sobre semilla, suelen fracasar en la ocupancia

de un número importante de los nódulos cuando una población rizobiana está establecida en los suelos (Bogino y col. 2006). Estudios posteriores nos demostraron que la posición de la bacteria en el perfil del suelo permite un acceso directo a los sitios infectables de la raíz cuando ésta penetra en el suelo (Bogino y col. 2008). Este fenómeno tendrá en nuestra investigación dos aspectos a explorar, por un lado la ventaja de la inoculación en surco en relación a la inoculación en semilla, y por otro lado la implicancia del efecto posicional en el mecanismo de ingreso vía “*crack-entry*” de los rizobios en el maní. Para facilitar el abordaje de este objetivo será dividido de la siguiente manera:

1a. Estudiar si la fuerte adhesión a la semilla y la consecuente formación de biofilm dificultan el acceso a la zona de infección de la raíz.

1b. Verificar si la atracción (quimiotaxis) a la semilla obstaculiza el acercamiento de la bacteria a la zona infectable de la raíz.

1c. Demostrar si la falta de movilidad bacteriana es el condicionante para la falta de respuesta cuando la bacteria se inocula en la semilla.

2- Evaluar la supervivencia, efectividad y cambios lipídicos de *Bradyrhizobium* sp. en ambientes adversos. La aplicación de biofertilizantes está ligada de una manera u otra al uso de agroquímicos como fungicidas e insecticidas y a las prácticas de labranza previas. Las consecuencias ambientales de los productos químicos sintéticos comprometen la fijación simbiótica del N conduciendo al aumento de la dependencia de los fertilizantes nitrogenados químicos y por lo tanto, a la reducción de la fertilidad del suelo y la disminución a largo plazo del rendimiento de las cosechas (Fox y col. 2007). En general, los estudios realizados para evaluar los efectos en la simbiosis maní-*Bradyrhizobium* se han limitado a examinar los efectos del fungicida en la nodulación y crecimiento de la planta sin evaluar si la pérdida de eficiencia estaba ligada a la supervivencia de la bacteria en el inoculante por posibles modificaciones en su envoltura celular como ocurre en presencia de factores abióticos (Medeot y col. 2007, Paulucci y col. 2011). En este sentido, se estudiará si se producen alteraciones a nivel de ácidos grasos de membrana en el microsimbionte sometido a esas condiciones. Se debe tener en cuenta que el maní se cultiva en suelos arenosos generalmente con deficiencias nutricionales, no existiendo bibliografía del efecto de estos suelos sobre la bacteria. Es nuestro interés por lo tanto, demostrar de qué manera se puede minimizar el efecto adverso sobre el biofertilizante, proponiendo para tal fin el uso diferentes técnicas de aplicación.

3- Determinar la influencia de la co-inoculación *Bradyrhizobium* sp.-*Azospirillum* sobre el crecimiento y la FBN en maní. Previamente ha sido demostrada que la co-inoculación de los rizobios con *Azospirillum*, una rizobacteria fijadora de N de vida libre, afecta de manera positiva a distintas leguminosas. Son numerosos los cambios que causa la inoculación de *Azospirillum*, co-inoculado o no con otros microorganismos, destacándose cambios en la fisiología y morfología de las raíces de las leguminosas, en la producción de fitohormonas, en la nodulación, entre otras (Burdman y col. 1996). Si bien ha sido documentado que la aplicación combinada de *Rhizobium* y *Azospirillum* mejora la nodulación y que este efecto podría ser atribuido al mejor desarrollo de las raíces producido por la bacteria de vida libre, no se deberían excluir otros factores que podrían estar involucrados, tales como los cambios en el metabolismo de los flavonoides producidos en la leguminosa (Lambrecht y col. 2000). En particular existe la experiencia de trabajos de biofertilización mixta para poroto y soja (Dardanelli y col. 2008). En la búsqueda de nuevas estrategias de biofertilización para maní, planeamos experimentar la co-inoculación en cuestión por medio de ensayos en el laboratorio y a campo.

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas bacterianas

Las bacterias del género *Bradyrhizobium* sp. empleadas fueron: C145 (origen NIFTAL Hawaii, USA, cepa recomendada como inoculante de maní por el Instituto Nacional Tecnología Agropecuaria, INTA Argentina), SEMIA6144 (origen FEPAGRO-MIRCEN, Brasil; inoculante de maní utilizado en Brasil), USDA4438 [origen Servicio de Investigación de Agricultura (ARS), Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA)] 15A y Pc34 (ambas cepas nativas aisladas de nódulos de maní en General Cabrera, Provincia de Córdoba).

Se empleó la cepa de referencia en Argentina, *Azospirillum brasilense* Az39 (Díaz-Zorita y Fernández 2009).

3.2 Medios y condiciones de cultivo de los microorganismos

3.2.1 Medios de cultivo para cepas de *Bradyrhizobium* sp.

Medio agar agua 0,3%

Agar	3,0 g
H ₂ O c.s.p.	1,0 l

Medio agar agua 0,5%

Agar	5,0 g
H ₂ O c.s.p.	1,0 l

Medio TY: modificado (Beringer 1974)

CaCl ₂ 2H ₂ O	0,4 g
Trypteina Bacteriológica	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
H ₂ O c.s.p.	1,0 l

Medio YEM: modificado (Vincent 1970)

Manitol	10,0 g
Extracto de levadura	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
H ₂ O d.c.s.p.	1,0 l

Medio TSA (tripteina soya agar)

Tripteina	15,0 g
Peptona de soya	5,0 g
NaCl	5,0 g
Agar	15,0 g
H ₂ O d.c.s.p.	1,0 l

pH 7,3 ± 0,2 a 25°C

3.2.2 Medios de cultivo para cepas de *Azospirillum***Medio LB (Luria-Bertani):** (Luria y Burrous 1955)

Glucosa	1,0 g
NaCl	5,0 g
Tripteina Bacteriológica	10,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
H ₂ O d.c.s.p.	1,0 l

Medio mínimo Nfb (Estevez Amador 2007)

Acido málico	5,0 g
KOH	4,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,02 g

FeEDTA (1,64%)	4,0 ml
Microelementos	2,0 ml
H ₂ O d.c.s.p.	1,0 l

Se ajustó el pH a un valor de 6,8. Se esterilizó en autoclave (120 °C, 20 min) y se agregó 1 ml de solución de vitaminas.

La solución de microelementos:

H ₃ BO ₃	1,4 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	1,2 g
MnSO ₄ H ₂ O	1,17 g
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	1,0 g
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,04 g
H ₂ O d.c.s.p.	100 ml

Solución de vitaminas:

Piridoxal-HCL	0,2 g
Biotina	0,1 g
H ₂ O d.c.s.p.	1,0 l

3.2.3 Soluciones nutritivas para ensayo de plantas de maní

Solución Hoagland (Hoagland y Arnon 1938)

CaCl ₂ 1M	10,0 ml/l	Solución de micronutrientes	
KCl 1M	10,0 ml/l	H ₃ BO ₃	1,24 g/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O 1mM	4,0 ml/l	MnCl ₂	1,81 g/l
MgSO ₄ 1M	4,0 ml/l	ZnCl ₂	0,11 g/l
KH ₂ PO ₄ 1M	2,0 ml/l	CuSO ₄	0,05 g/l
FeCl ₃ 5 mg/ml	2,0 ml/l	NaMoO ₄	0,025 g/l
Solución de micronutrientes	2,0 ml/l		

Medio Jensen (Vincent 1970)

CaHPO ₄	1,0 g	Solución de oligoelementos:	
K ₂ HPO ₄	0,2 g	H ₃ BO ₃	0,05%
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2 g	MnCl ₂	0,05%



NaCl	0,2 g	ZnSO ₄ H ₂ O	0,05%
FeCl ₃	0,1 g	NaMoO ₄ 5H ₂ O	0,005%
Oligoelementos	1,0 ml	CuSO ₄ 5H ₂ O	0,002%
H ₂ O d. c. s. p.	1,0 l		

3.3 Condiciones de cultivo

La temperatura de incubación para los cultivos de las cepas bacterianas empleadas fue de 30 °C. Los cultivos en medios líquidos fueron agitados a 150 rpm en agitador rotatorio.

*Para solidificar los medios se agregó 1,5 % p/v de agar-agar.

*La esterilización fue realizada en autoclave a 120 °C por 20 min.

3.4 Medio de conservación

La conservación de las cepas bacterianas se llevó a cabo mediante congelamiento de cultivos crecidos hasta fase exponencial tardía, en tubos de conservación con la adición de glicerol estéril a concentración final de 20 % y almacenados a -20 °C y -80 °C.

3.5 Estudio del crecimiento bacteriano

A partir de un cultivo inicial de la bacteria en medio rico (D.O.600 nm entre 0,8 y 1) se inoculó un erlenmeyer con 20 ml de medio de cultivo (D.O.600 nm cercana a 0,01-0,02) y se determinó la variación de la D.O.600 nm a lo largo del tiempo. Los erlenmeyers fueron incubados a 30 °C en agitación (150 rpm) hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. Paralelamente se realizó un recuento de células viables en distintos puntos de la curva en placas de medio YEM, cada uno por triplicado, para establecer una correcta relación entre turbidez y viabilidad celular, determinada como unidades formadoras de colonia (UFC)/ml.

3.6 Condiciones de crecimiento vegetal

3.6.1 Material vegetal

Semillas de maní (*Arachis hypogaea* L. cv Granoleico) fueron cedidas gentilmente por el Ing. Juan Soave del Criadero El Carmen, General Cabrera, Córdoba.

3.6.2 Desinfección superficial y germinación de semillas

Se cubrió a las semillas a desinfectar con alcohol etílico al 96% durante 30 segundos y posteriormente se lavaron dos veces con agua destilada estéril. Luego se adicionó peróxido de hidrógeno al 15% v/v, agitando suavemente durante 7 min. Posteriormente se lavaron diez veces con agua destilada estéril.

Las semillas desinfectadas se colocaron en placas de petri con agar agua al 0.8% y se las dejó germinar durante 3 días en estufa a 30°C.

3.6.3 Obtención de exudados de semilla

Se colocaron 20 semillas desinfectadas de maní en un vaso de precipitado previamente esterilizado en autoclave. Se les agregó 20 ml de agua destilada estéril y se incubó durante 16 horas en un ambiente protegido de la luz. Luego el líquido fue esterilizado por filtración con filtros de nitrato de celulosa de 0,45 μm . Se alicuotaron en eppendorf estériles y se almacenaron a -20 °C.

3.7 Estudios de formación de biofilm

3.7.1 Ensayo de microplacas

La capacidad de formación de biofilm fue determinada mediante un ensayo cuantitativo en microplacas de 96 pocillos de PVC en el que los biofilms fueron teñidos con cristal violeta (CV) (O'Toole y Kolter 1998). Las microplacas fueron superficialmente esterilizadas bajo radiación UV y cada pocillo fue inoculado con 150 μl de un cultivo bacteriano crecido en medio YEM (D.O.600 nm 0,4 aproximadamente). Luego de la inoculación las placas fueron cubiertas con una tapa plástica estéril para prevenir la evaporación y contaminación, e incubadas sin agitación a 30 C° durante 72 h. Luego los contenidos de cada pocillo fueron homogenizados suavemente por pipeteo y el crecimiento bacteriano fue medido por absorbancia a 600 nm. Las células libres fueron removidas de los pocillos, los cuales fueron lavados tres veces con solución fisiológica, vaciados y teñidos con cristal violeta al 0,1 % durante 15 min. Posteriormente fueron enjuagados con agua destilada tres veces.

3.7.2 Cuantificación de la formación de biofilm

El biofilm generado por cada rizobio fue cuantificado mediante la adición de 200 µl de etanol al 96% a cada uno de los pocillos teñidos y la absorbancia del CV solubilizado fue determinada en un lector de Elisa (Multiskan MS Primary EIA V.1.8-0) a 560 nm. Las medidas de crecimiento bacteriano fueron realizadas por triplicado y repetidas al menos tres veces y los valores medios y las desviaciones estándar calculadas.

3.8 Ensayos de movilidad

3.8.1 Swimming (agar 0,3%)

Se prepararon diferentes medios de cultivos con el agregado de agar al 0,3%, los medios utilizados fueron agar agua, agar agua + 10% YEM, YEM y TY. Para estos ensayos se utilizaron placas de petri a las cuales se les agregó 20 ml de medio y se las dejó secar en campana de flujo laminar (Déziel y col. 2001).

Las diferentes cepas de rizobios utilizadas se sembraron por picadura en el centro de la placa con un ansa de punta. Las cepas de *Bradyrhizobium* provenían de placas de 8 días de crecimiento en medio YEM.

3.8.2 Swarming (agar 0,5%)

Se prepararon diferentes medios de cultivos con el agregado de agar al 0,5%, los medios utilizados fueron agar agua, agar agua + 10% YEM, YEM y TY. Para estos ensayos se utilizaron placas de petri a las cuales se les agregó 20 ml de medio y se las dejó secar en campana de flujo laminar.

Los diferentes rizobios utilizados se sembraron apoyando suavemente el ansa de punta sobre la superficie del medio. Todos los microorganismos utilizados provenían de placas de 8 días de crecimiento en medio YEM.

3.8.3 Influencia de diferentes factores sobre la movilidad bacteriana

Los ensayos anteriormente descritos, fueron modificados para analizar el efecto sobre la movilidad de: temperaturas sub-óptimas de crecimiento, diferentes tiempos de incubación, efecto de exudado de semilla, la adición de diferentes fuentes de carbono y agregado de los

fungicidas Carboxin 20 % + Tiram 20 % a una dosis de 200 cm³/100 Kg semilla (MT) y Fludioxonil 2,5% + Metalaxil 1% a una dosis de 100 cm³/100 kg de semilla (FM). Las temperaturas utilizadas fueron de 30 °C y 23 °C. Las placas con los diferentes tipos movilidad se incubaron durante 8, 16, 24 y 32 días a 30 °C. Para los estudios del efecto del exudado de semilla de maní un volumen de 8 µl de exudado el cual provenía de un volumen 10 veces concentrado, se añadió a un filtro que fue colocado a 0,5 cm del radio de movilidad promedio de cada cepa. Las fuentes de carbono utilizadas fueron 4 monosacáridos (glucosa, fructosa, manosa, y arabinosa) y 1 polialcohol (manitol). Los mismos se utilizaron a una concentración de 0,1 % en medio agar agua. Los fungicidas MT y FM se agregaron a los medios de movilidad a una concentración del 0,2 y 0,1 % respectivamente.

3.9 Microscopía electrónica de barrido

Para la determinación del tamaño celular y el análisis morfológico de los rizobios en estudio, células vegetativas y swarm se fijaron en glutaraldehído al 2,5% y fueron almacenados a 48 °C durante 24 h. Las muestras fueron secuencialmente deshidratadas durante 10 min en soluciones de etanol al 50, 70, 90, y 96% y luego dos veces durante 20 min en etanol absoluto, como se describe por Kockro y col. (2000). Luego del secado por punto crítico las muestra se fijaron en cinta de cobre doble capa, fueron colocadas sobre soportes de aluminio y recubiertos con una capa de oro fino en un Baltec SCD 050 Sputter (Bal-Tec, EE.UU.) a 40 mA/150 s. Una vez realizado el recubrimiento de las muestras, las mismas fueron examinadas bajo un microscopio Joel JMST300 SEM (Joel Inc., Japón).

3.10 Extracción de lípidos

Los lípidos fueron extraídos de las células lavadas con una mezcla de cloroformo/metanol/agua según lo descrito por Bligh y Dyer (1959), luego se agregó una solución 0,1 M KCl en 50 % de metanol para obtener una fase inferior clorofórmica y una fase superior acuosa. La fase inferior, que contiene los lípidos, fue lavada dos veces con la misma solución de KCl, secada bajo flujo de N y resuspendida en un volumen apropiado de cloroformo/metanol 2:1 (v/v).

3.11 Análisis de ácidos grasos

Los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) fueron obtenidos a partir de los extractos lipídicos de células crecidas en medio YEM hasta una D.O.600 nm de 0,6, luego a los diferentes tratamientos se les agregó MT y FM a una concentración de 0,2 y 0,1 % respectivamente haciéndolos crecer por 24 h.

Los mismos se analizaron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890, serie II equipado con una columna de metil-silicona (50 m x 0,2 mm x 0,33 μ m), acoplado a un detector de ionización de llama. La temperatura de la columna se programó a 180 °C durante 25 min y luego una rampa de 3 °C/minuto hasta alcanzar 250 °C. Temperatura del detector: 300 °C. Temperatura del inyector: 250 °C. Los picos correspondientes a cada AG se identificaron usando una mezcla de testigos provista por Sigma-Aldrich Chemical Co (Kates 1973).

3.12 Ensayo de co-inoculación en invernadero

El ensayo se llevó a cabo en macetas de 100 g de vermiculita, regadas con 100 ml de agua destilada estéril. Cada maceta portaba una planta, con 10 repeticiones para cada tratamiento los cuales fueron:

- Sin inocular (control negativo).
- Inoculados con *Bradyrhizobium* C145, SEMIA6144, USDA4438, 15A y Pc34.
- Inoculados con *A. brasilense* Az39.
- Co-inoculadas *Bradyrhizobium-A. brasilense* Az39.

Una vez desinfectadas y pre germinadas las semillas, se depositaron una por maceta y se inocularon. Para las inoculaciones simples se colocó 1 ml del cultivo de las diferentes cepas de *Bradyrhizobium* con un recuento de 10^9 UFC/ml y 1 ml de *A. brasilense* Az39 con un valor de viables de 10^6 UFC/ml, mientras que los tratamientos co-inoculados se utilizó 1 ml de una cepa de *Bradyrhizobium* y 1 ml del cultivo de *Azospirillum*. Las plantas fueron cultivadas durante 32 días en una cámara de cultivo con un ciclo de 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad a 24 °C y la humedad relativa se mantuvo entorno al 80%. Los riegos se efectuaron en días alternos a lo largo de los 32 días, con agua destilada estéril y solución Jensen sin nitrógeno estéril.

Se determinaron seis parámetros en cada ensayo: longitud de tallo y raíz medidos en cm, peso seco de parte aérea y raíz expresado en mg/planta, número de nódulos/planta y peso seco de nódulos estimado en mg/planta.

3.13 Ensayos de inoculación a campo

3.13.1 Ensayo a campo, campaña 2010-2011

El ensayo se realizó en un campo experimental ubicado en la localidad cordobesa de Chaján, dirigido técnicamente por el Ing. Guillermo Cerioni, docente de la Facultad de Agronomía y Veterinaria (UNRC). Los tratamientos consistieron de inoculación en surco con la cepa de *Bradyrhizobium* C145 (recomendada por INTA para ser utilizada para inocular cultivos de maní), inoculación con *Azospirillum* Az39, co-inoculación con *Bradyrhizobium* C145-*Azospirillum* Az39 y controles sin inocular. Se sembró una superficie de 1 ha por tratamiento. La densidad de siembra fue de 16 semillas por metro (m) lineal. En todos los casos las semillas fueron tratadas con el fungicida Carboxin 20 % + Tiram 20 %, a una dosis de 200 ml/100 Kg semilla. La inoculación en surco se realizó aplicando 1,5 l de inoculante por ha de *Bradyrhizobium* C145 y 1 l de inoculante por ha de *Azospirillum* Az39. Los inoculantes (Nitrasoil) empleados contenían aproximadamente 1×10^9 células ml^{-1} .

3.13.2 Ensayo a campo campaña 2013-2014

El ensayo se realizó en un campo ubicado en la localidad cordobesa de Dalmacio Vélez, dirigido técnicamente por el Ing. Guillermo Cerioni, docente de la Facultad de Agronomía y Veterinaria (UNRC). Los tratamientos consistieron de co-inoculaciones en surco con las cepas de *Bradyrhizobium* C145, 15A, Pc34 y *Azospirillum* Az39 y de controles sin inocular. Cada tratamiento fue realizado en cuatro parcelas (repeticiones distribuidas aleatoriamente) de siete surcos de 5 m de largo distanciados 0,7 m entre sí. La densidad de siembra fue de 16 semillas por metro lineal. En todos los casos las semillas fueron tratadas con el fungicida Carboxin 20 % + Tiram 20 %, a una dosis de 200 ml/100 Kg semilla. La inoculación en surco se realizó aplicando 1,5 l de inoculante por ha de *Bradyrhizobium* y 1 l de inoculante por ha de *Azospirillum* Az39. Las formulaciones empleados contenían aproximadamente 1×10^9 UFC/ml. A los 60 días se tomaron muestras de plantas. A los diferentes tratamientos se les estimó la medida de tallo, peso seco de parte aérea, número y peso seco de nódulos.



Alrededor de los 150 días post siembra, plantas recogidas de una superficie de 1 m² fueron cosechadas y analizadas para determinaciones de peso de parte aérea, número y peso seco de nódulos y peso de cajas.

3.14 Análisis estadístico

Las experiencias fueron realizadas en diseños aleatorizados y los valores representan las medias de tres repeticiones. Los datos se analizaron empleando el test de ANOVA con una comparación múltiple de variables por el test de LSD Fisher considerando diferencia significativa un nivel de $P=0,05$. Todos los análisis estadísticos se evaluaron con el software InfoStat (Estadística y Biometría, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba).

CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Selección de rizobios simbiotes de maní para estudios de movilidad y quimiotaxis

Los antecedentes previamente expuestos indican el problema que suelen tener las bacterias empleadas como inoculantes al momento de ser utilizadas. Adicionalmente, gran parte de los resultados publicados se han obtenido estudiando la simbiosis rizobio-leguminosa en estadios avanzados de interacción, desconociendo que sucede en los eventos tempranos de la asociación y que son condicionantes para la FBN. Como ya se conoce a través de diferentes reportes bibliográficos, el maní es una planta que puede ser nodulada por rizobios de crecimiento rápido y lento, los cuales muestran a su vez diversas propiedades de promoción de crecimiento vegetal (Fabra y col. 2010). Dentro de ellas estas propiedades, una muy importante es la capacidad de formación de biofilm (Bogino 2008). En referencia a esta última particularidad, de una colección de rizobios simbiotes de maní se seleccionaron 26 cepas, las cuales se caracterizaron en base a su capacidad de formación de biofilm según lo detallado en el apartado 3.7 de materiales y métodos. Los resultados de la figura 3 indican que del total de las cepas, el 53,84% mostró valores de formación de biofilm superiores a 1,5 (D.O.560 nm) después de 3 días de ensayo. En base a este alto porcentaje de rizobios simbiotes de maní formadores de biofilm y sobre la premisa de esta tesis doctoral, se seleccionaron 4 rizobios señalados con color negro en la figura 3.

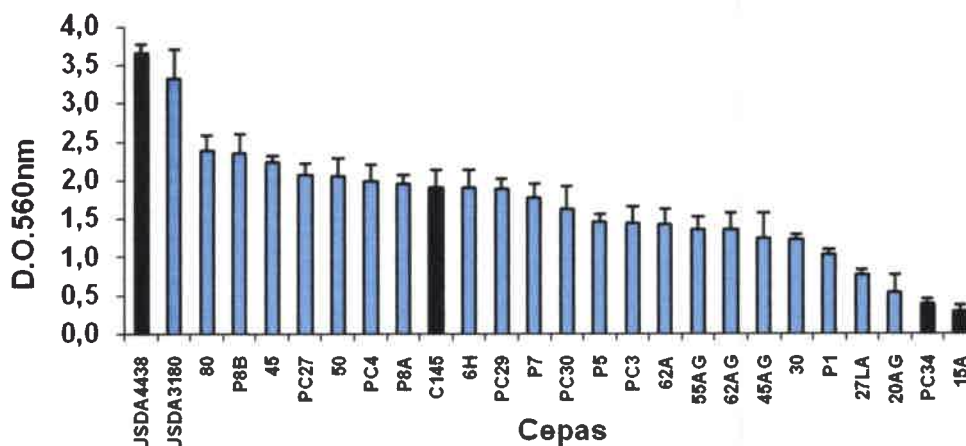


Figura 3 Capacidad de formación de biofilm de rizobios simbioses de maní nativos y recomendados, después de 72 h de incubación en medio YEM.

De los 4 rizobios seleccionados el de mayor formación de biofilm fue USDA4438 que presentó un valor de D.O.560 nm de 3,658. La cepa recomendada para la producción de inoculantes para maní en Argentina por el INTA, C145, presentó un registro intermedio de 1,911. Las cepas de menor producción de biofilm fueron Pc34 y 15A, ambas nativas y con un valor de D.O.560 nm de 0,399 y 0,291, respectivamente. En esta etapa de selección de cepas bacterianas de variable capacidad de formación de biofilm, decidimos determinar su capacidad de movilidad en diferentes condiciones experimentales y su quimiotaxis.

4.2 Caracterización de la movilidad de rizobios simbioses de maní

Las bacterias constantemente monitorean las señales de su ambiente y se adaptan a las condiciones imperantes modulando su capacidad de movilidad. Parte de las señales que detectan pueden ser de origen ambiental o las producidas por otros organismos y en el caso de los rizobios, este evento puede ocurrir en la rizósfera de las leguminosas o sobre la superficie de las raíces. Para conocer si los rizobios en estudio con variable capacidad de formación de biofilm muestran algún tipo de movilidad, realizamos un ensayo de swimming y de swarming. De todas las cepas recomendadas como inoculantes, *Bradyrhizobium* SEMIA6144 es uno de los simbioses de mayor caracterización fenotípica, genotípica y de simbiosis sobre maní (Medeot y col. 2007, 2010; Menna y col. 2009) por lo tanto se incluyó a esta cepa dentro del grupo de estudio para poder analizar con mayor precisión los resultados obtenidos.

4.2.1 Caracterización de la concentración de agar para la observación de la movilidad de rizobios simbiotes de maní

Los cinco rizobios en estudio, C145, SEMIA6144, USDA4438, 15A y Pc34, crecieron en placas de petri con medio de cultivo YEM. Luego de 8 días de incubación a 30 °C, en forma individual y asépticamente de cada placa se seleccionó una colonia y se sembró en picadura en medio de una placa con medio agar agua. Las concentraciones de agar utilizadas en el ensayo fueron de 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,8% y 1%, cuyos datos se referencian en la figura 4. Como puede observarse, todas las bacterias estudiadas presentaron movilidad en el rango de concentraciones de agar empleado, donde el mayor diámetro de movilidad fue obtenido con agar 0,3% seguido de agar 0,5% y para todos los rizobios de estudio.

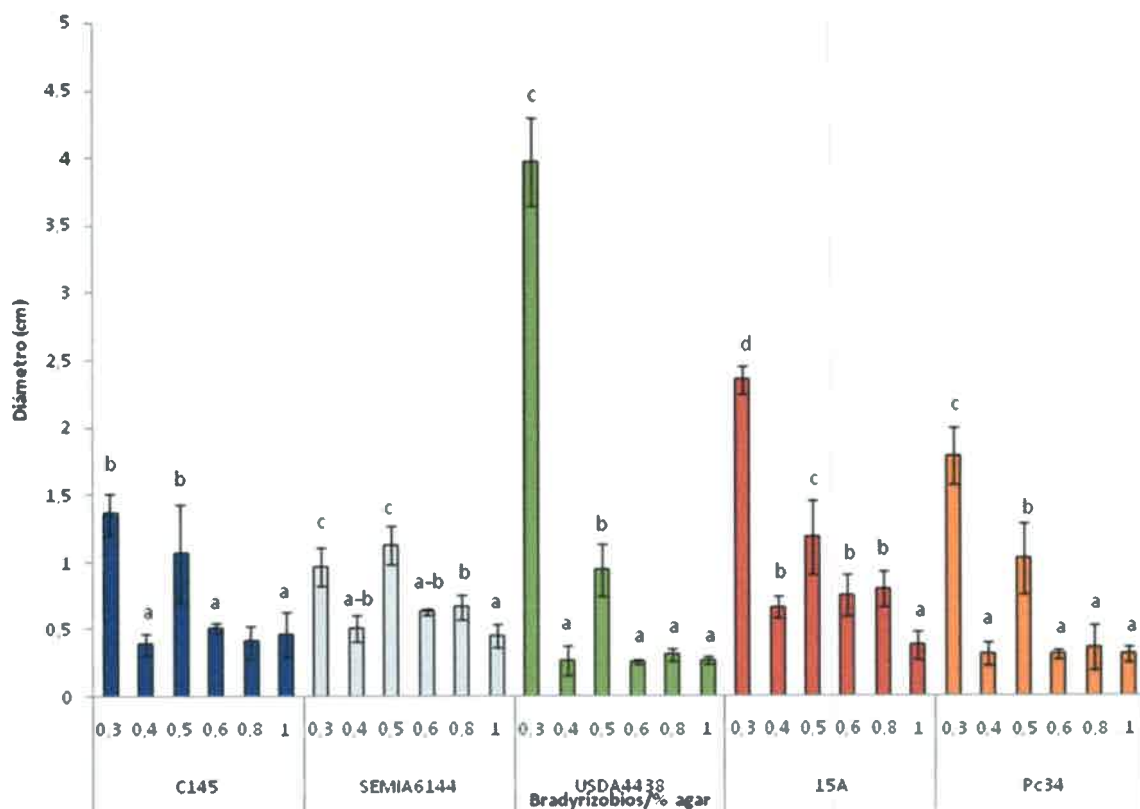


Figura 4 Movilidad de rizobios simbiotes de maní sobre medio agar agua a diferentes concentraciones. Las bacterias previamente fueron crecidas en medio YEM con agar al 1,5%. Los datos se corresponden a la media ± SD de 3 repeticiones independientes. ANOVA, test LSD Fisher, $p < 0,05$. Letras diferentes en las barras indican que las diferencias son estadísticamente significativas.

Harshey (2003) y Verstraeten (2008) señalan que la habilidad para realizar movilidad tipo swarming es crítica para diversos géneros bacterianos como por ejemplo, *Vibrio* y

Proteus que muestran su movilidad entre 1,5 y 3% de agar, mientras que *Salmonella*, *Escherichia*, *Serratia*, *Pseudomonas* y *Bacillus* tienen movilidad swarming entre 0,5 y 0,8% de agar. Los rizobios nodulantes de maní empleados para este estudio tuvieron la capacidad de realizar movilidad tipo swarming en el rango de concentración de agar ensayado del 0,4% al 1%. En nuestro caso, es de destacar la alta movilidad detectada frente a 0,3% de agar, lo que sería indicativo de que estas cepas manifiestan su movilidad swimming en dicha concentración. Para poder realizar una completa caracterización de swimming y swarming para los rizobios en estudio, seleccionamos las concentraciones de agar 0,3% y 0,5%, respectivamente. La respuesta diferencial a la concentración de agar en ensayos de swarming sería una estrategia de resistencia a factores ambientales adversos, implicando para ello una alta densidad celular y muerte de las células que tiene contacto directo con el agente nocivo. También, es posible que este comportamiento diferencial de movilidad que poseen ciertos géneros bacterianos y los rizobios simbiotes de maní ensayados implique una relación entre velocidad de swarming y adaptación ambiental (Butler y col. 2010).

4.2.2 Ensayo de movilidad tipo swimming (agar 0,3%)

Una vez determinado que los cinco rizobios simbiotes de maní muestran movilidad tipo swimming cuando la concentración de agar es de 0,3%, se decidió comenzar la caracterización de la misma. Para ello, sobre el soporte sólido, se agregaron diferentes concentraciones y tipos de medios de cultivos a fin de determinar si el swimming se modificaría por la presencia de los mismos.

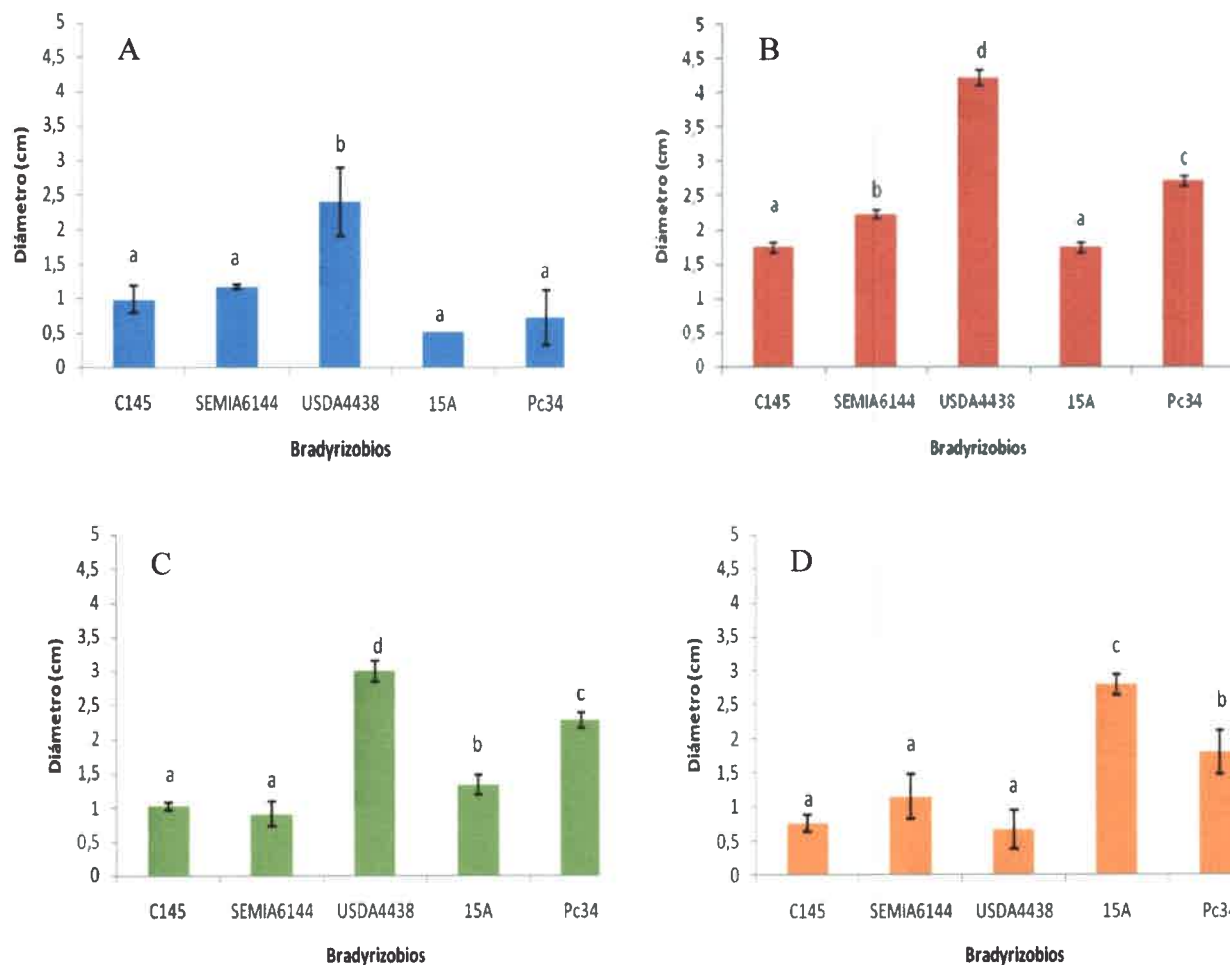


Figura 5 Movilidad swimming de rizobios simbiotes de maní en diferentes soportes. **A** medio agar agua 0,3%, **B** medio agar agua 0,3% + 10% YEM, **C** medio YEM 0,3% y **D** medio TY 0,3%. Los datos se corresponden a la media \pm SD de 3 repeticiones independientes. ANOVA, test LSD Fisher, $p < 0,05$. Letras diferentes en las barras indican que las diferencias son estadísticamente significativas.

Los diámetros de movilidad obtenidos en éstas nuevas condiciones experimentales se evidencian en la figura 5 en los paneles A (agar agua 0,3%), B (agar agua 0,3% + 10% YEM), C (YEM 0,3%) y D (TY 0,3%). El panel A muestra en forma comparativa la movilidad tipo swimming entre las cinco bacterias en el medio nutricionalmente deficiente agar agua, donde la cepa de referencia USDA4438 presentó diferencias estadísticamente significativa en el diámetro de movilidad comparada con el resto de las bacterias ensayadas, de igual manera que en el panel A, USDA4438 presentó los mismos valores de movilidad para los medios agar agua + 10% YEM y YEM, representados por los paneles B y C respectivamente, seguida por la cepa nativa Pc34. Cuando se utilizó al medio TY para ensayar la movilidad tipo swimming,

las cepas de mayor movilidad fueron las dos nativas, 15A seguida por Pc34 sin observarse diferencias entre las cepas de referencia (panel D).

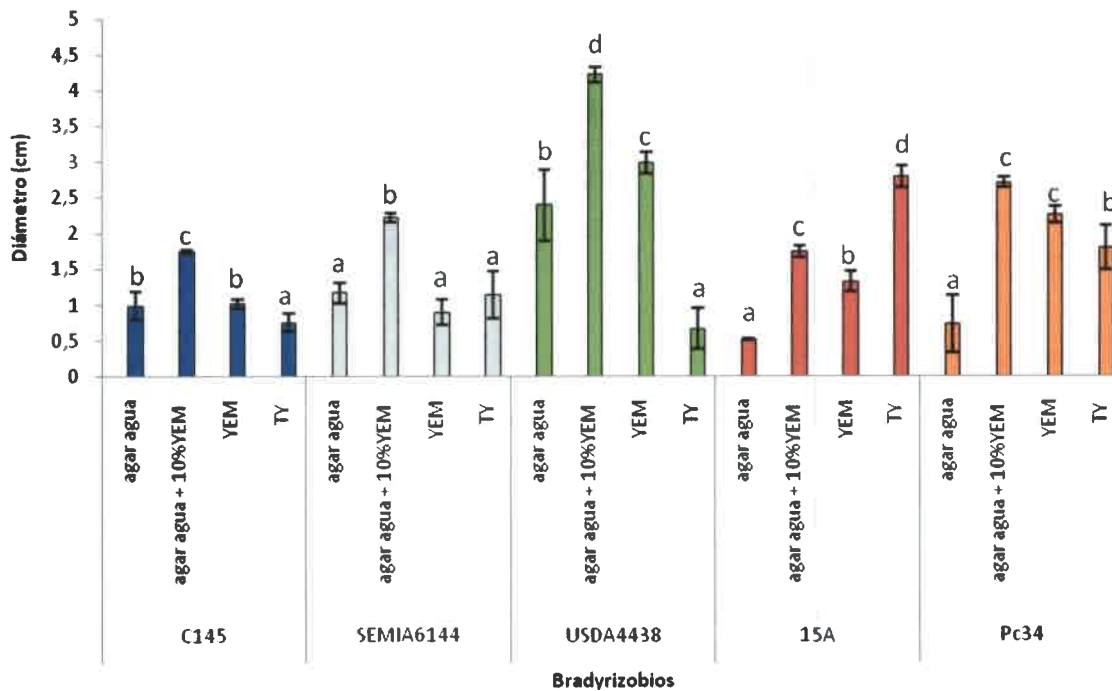


Figura 6 Movilidad de rizobios simbioses de maní sobre medio agar agua, agar agua + 10% YEM, YEM y TY con una concentración de agar del 0,3%. Las bacterias previamente fueron crecidas en medio YEM con agar al 1,5%. Los datos se corresponden a la media \pm SD de 3 repeticiones independientes. ANOVA, test LSD Fisher, $p < 0,05$. Letras diferentes en las barras indican que las diferencias son estadísticamente significativas.

En la figura 6 puede observarse en forma conjunta el comportamiento que cada rizobio tuvo frente a la adición de los medios de cultivo. De forma casi generalizada, el medio cultivo en el cual se obtuvieron los mayores diámetros de movilidad fue en agar agua + 10 % YEM, siendo la cepa nativa 15A el único rizobio que obtuvo un máximo de movilidad en medio TY seguido por agar agua 0,3% + 10% YEM. A partir del análisis de los diferentes medios cultivos empleados, se decidió utilizar agar agua + 10% YEM para posteriores ensayos de swimming.

En la figura 7, se puede observar a modo de ejemplo la movilidad de los cinco rizobios de estudio en medio agar agua + 10% YEM, presentando USDA4438 un halo de movilidad significativamente mayor al resto de las cepas.

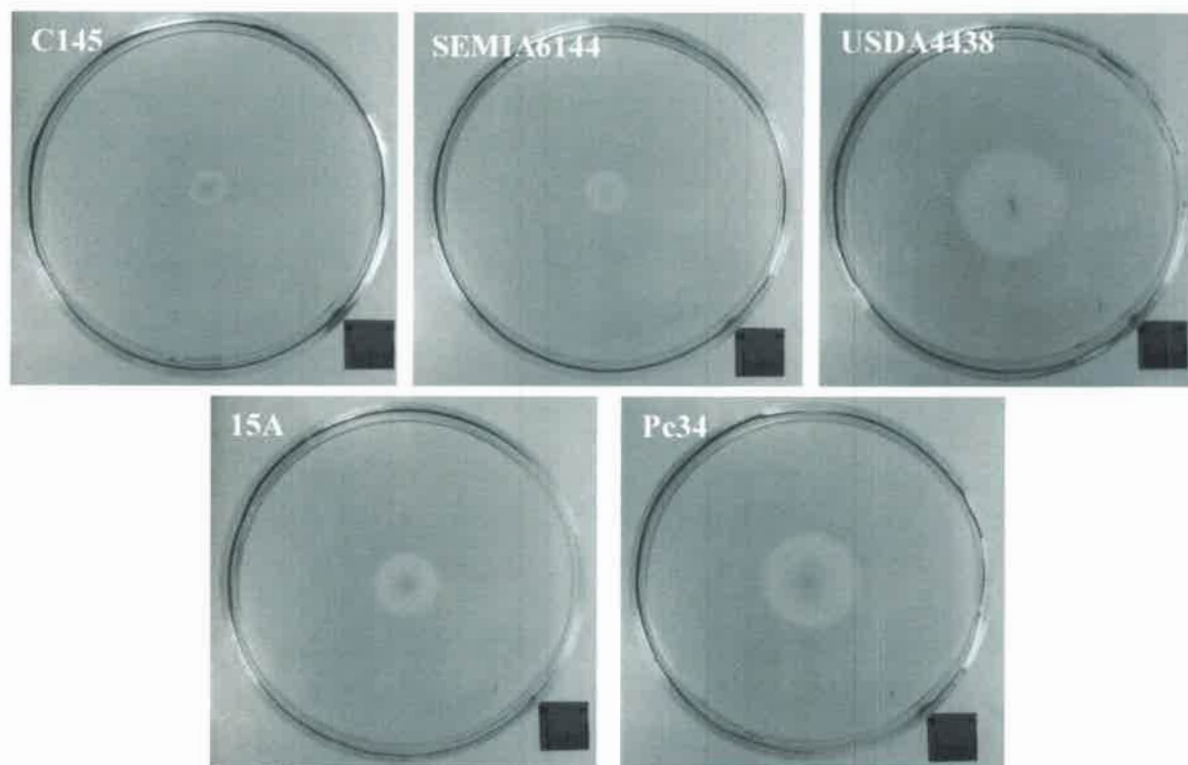


Figura 7 Movilidad swimming de rizobios simbioses de maní sobre agar agua + 10% YEM con una concentración de agar del 0,3%. Las bacterias fueron crecidas previamente en medio YEMA al 1,5%.

4.2.3 Ensayo de movilidad tipo swarming (agar 0,5%)

De manera análoga a la utilizada para la movilidad tipo swimming, se determinó para cada uno de los simbioses de maní en estudio si la adición de diferentes proporciones y medios de cultivos serían capaces de afectar el comportamiento swarming. Los diámetros de movilidad obtenidos en estas nuevas condiciones experimentales se muestran en la figura 8 en los paneles A (agar agua 0,5%), B (agar agua 0,5% + 10% YEM), C (YEM 0,5%) y D (TY 0,5%).

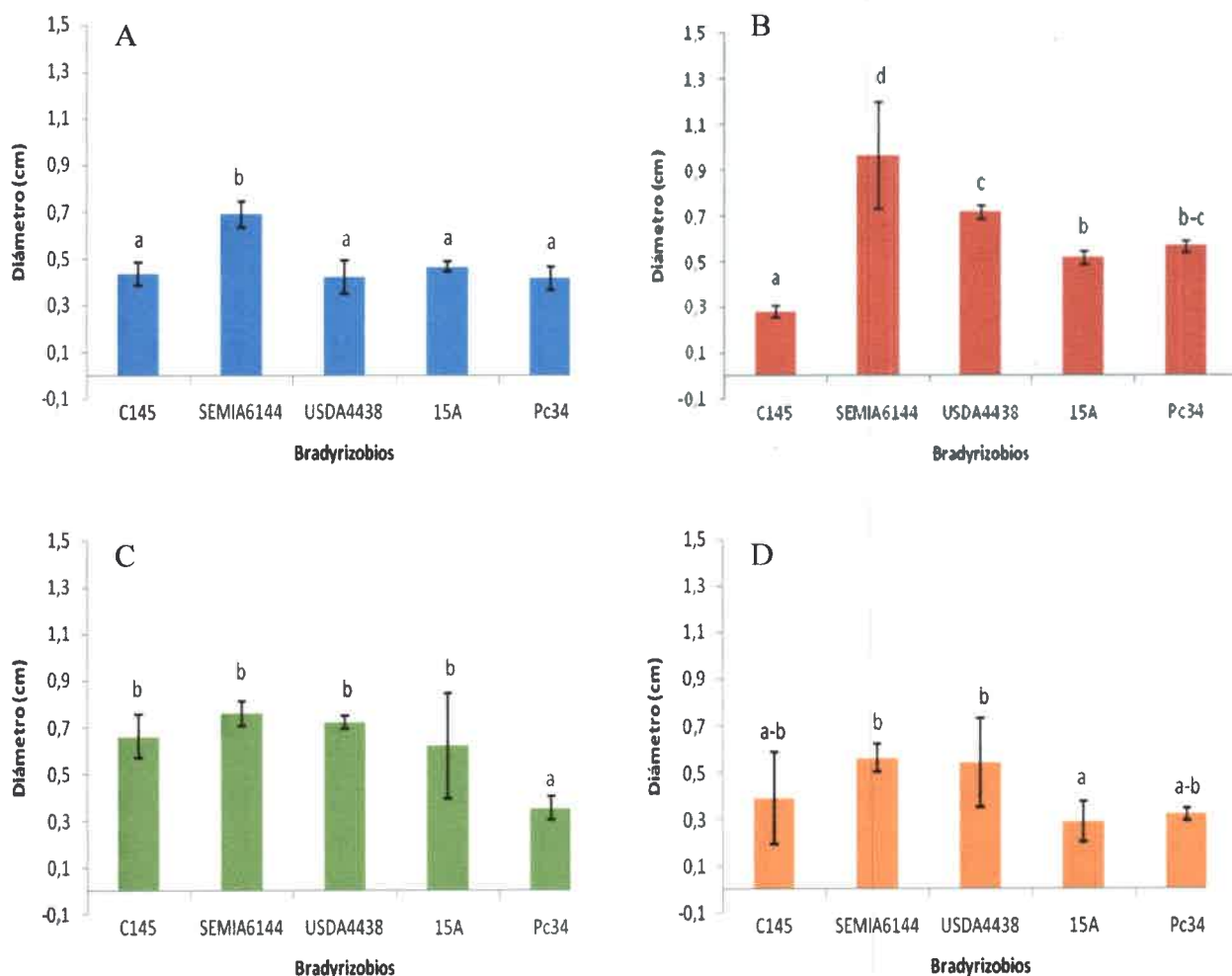


Figura 8 Movilidad swarming de rizobios simbiotes de maní en diferentes soportes. **A** medio agar agua 0,5%, **B** medio agar agua 0,5% + 10% YEM, **C** medio YEM 0,5% y **D** medio TY 0,5%. Los datos se corresponden a la media \pm SD de 3 repeticiones independientes. ANOVA, test LSD Fisher, $p < 0,05$. Letras diferentes en las barras indican que las diferencias son estadísticamente significativas.

El panel A muestra en forma comparativa la movilidad tipo swarming entre las cinco bacterias en el medio nutricionalmente deficiente agar agua, donde puede observarse que la cepa de referencia SEMIA6144 presentó el mayor diámetro de movilidad de las cinco cepas bacterianas ensayadas. De igual manera que en el panel A, SEMIA6144 presentó los mayores valores de movilidad en el medio agar agua + 10% YEM (panel B) seguido por la cepa USDA4438 y Pc34. Cuando se utilizó como medio de movilidad YEM (panel C), la cepa nativa Pc34 presentó una movilidad disminuida comparada con el resto de las cepas ensayadas, que no presentaron diferencias estadísticas en el diámetro de movilidad entre ellas.

En el panel D se puede observar la movilidad en medio TY, donde las cepas de referencia SEMIA6144 y USDA4438 obtuvieron los máximos valores de movilidad.

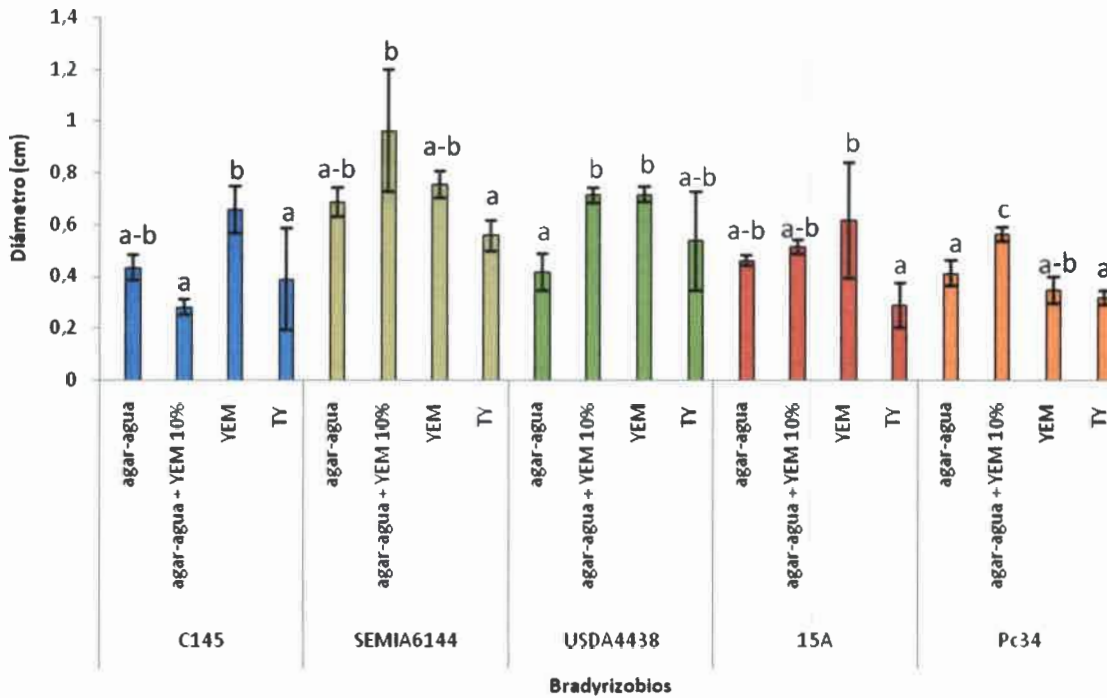


Figura 9 Movilidad de rizobios simbiotes de maní sobre medio agar agua, agar agua + 10% YEM, YEM y TY con una concentración de agar del 0,5%. Las bacterias previamente fueron crecidas en medio YEM con agar al 1,5%. Los datos se corresponden a la media \pm SD de 3 repeticiones independientes. ANOVA, test LSD Fisher, $p < 0,05$. Letras diferentes en las barras indican que las diferencias son estadísticamente significativas.

En la figura 9 puede observarse en forma conjunta el comportamiento que cada rizobio tuvo frente a la adición de los medios de cultivo. Para el swarming, las cepas no presentaron un comportamiento homogéneo debido a que cada rizobio ha mostrado su máxima capacidad swarming frente a diferentes medios y proporciones, pero podemos destacar que agar agua 0,5% + 10% YEM fue la condición donde la mayoría de las bacterias mostraron una buena capacidad swarming. Por lo tanto se seleccionó esta condición experimental para continuar con la caracterización swarming de los rizobios.

En la figura 10 se puede observar a modo de ejemplo la movilidad de los 5 rizobios de estudio en medio agar agua + 10% YEM, siendo notorio el menor halo de movilidad que presentan los rizobios simbiotes de maní a esta concentración de agar.

Las diferencias presentadas en los diámetros de los halos de movilidad de las rizobacterias ensayadas no se deben a variaciones del tiempo de crecimiento de las cepas

estudiadas, ya que las mismas poseen tiempos de generación similares (Bogino y col. 2010). Comparando nuestros resultados, las mayores diferencias de desplazamiento han sido obtenidas en la movilidad tipo swimming (figura 5 y 6), donde las diferencias que existen en este último movimiento podrían deberse a variabilidad genéticas, a pesar de que todos los aislados comparten la capacidad de nodulación sobre maní. Los resultados aquí presentados son los primeros en reportar que diferentes simbiontes de maní tienen movilidad tipo swimming y swarming, características altamente valorable para aquellas cepas que deseen ser empleadas en formulaciones microbianas.

A modo de ejemplo, en la figura 10 se puede observar la movilidad de los cinco rizobios de estudio en medio agar agua + 10% YEM con el agregado de agar al 0,5%.

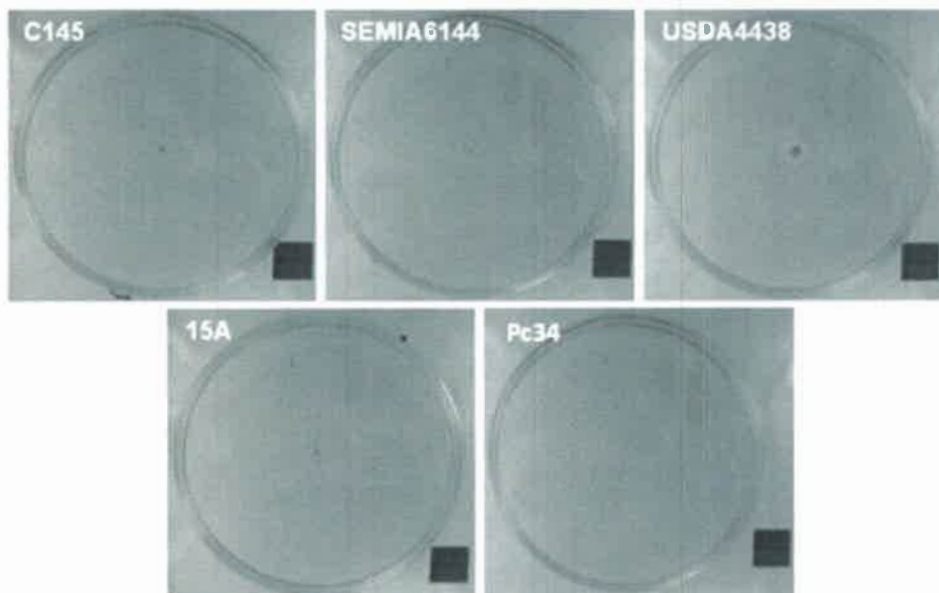


Figura 10 Movilidad swarming de rizobios simbiontes de maní sobre agar agua + 10% YEM con una concentración de agar del 0,5%. Las bacterias fueron crecidas previamente en medio YEMA al 1,5%.

4.3 Influencia de diferentes factores sobre la movilidad bacteriana

Tambalo y col (2010), reportaron que la movilidad swarming para *R. leguminosarum* 2841 y VF39SM fue dependiente del medio de crecimiento, de la concentración de agar así como de la temperatura de incubación en el cual se realizó el ensayo. Otra característica señalada por estos autores, fue el mayor número de flagelos de las células swarm del halo de movilidad swarming en comparación con aquellas que se ubicaron en medio de la colonia, así como una mayor resistencia frente a antibióticos. Otra particularidad citada, fue una cierta dependencia de esta movilidad con el metabolismo carbonado de la bacteria.

Teniendo en cuenta estos antecedentes así como las características del cultivo del maní (tipo de suelo, período de labranza, temperatura de siembra, entre otros factores), se evaluó si la movilidad swimming y swarming ya establecidas en los puntos 4.2.2 y 4.2.3 respectivamente, podrían verse afectadas por los principales factores asociados a los eventos tempranos de interacción simbiótica: temperaturas sub-óptimas de crecimiento, diferentes tiempos de incubación del ensayo de movilidad, efecto de exudados de semillas, adición de diversas fuentes de carbono y agregado de los fungicidas MT y FM.

4.3.1 Ensayo de movilidad tipo swimming y swarming a temperatura sub-óptima de crecimiento (23 °C)

Según lo detallado en el apartado experimental 3.8.3 de materiales y métodos la información bibliográfica para rizobios indica que la temperatura óptima para los ensayos de movilidad es de 30 °C. Si consideramos que el inicio de la labranza del cultivo de maní es a partir de septiembre donde las temperaturas del suelo varían entre 16 y 23 °C, y que dichos valores se consideran como temperaturas sub-óptimas para la fisiología microbiana de los rizobios simbios de maní, evaluamos el efecto que la temperatura de 23 °C ejerció sobre ambos tipos de movilidad.

El panel A de la figura 11, muestra los resultados obtenidos de la movilidad de los rizobios simbios de maní en medio agar agua 0,3% con el agregado de 10% de YEM, revelando que la cepa de referencia USDA4438 duplicó el valor de movilidad del resto de los rizobios ensayados, mientras que la segunda cepa más móvil fue la cepa nativa Pc34 seguida de 15A.

En el panel B se encuentran graficados los valores de movilidad tipo swarming en medio agar agua 0,5% enriquecido con un 10% de YEM. A diferencia de lo observado en el panel A, los rizobios más móviles fueron las dos cepas de referencia, SEMIA6144 y C145.

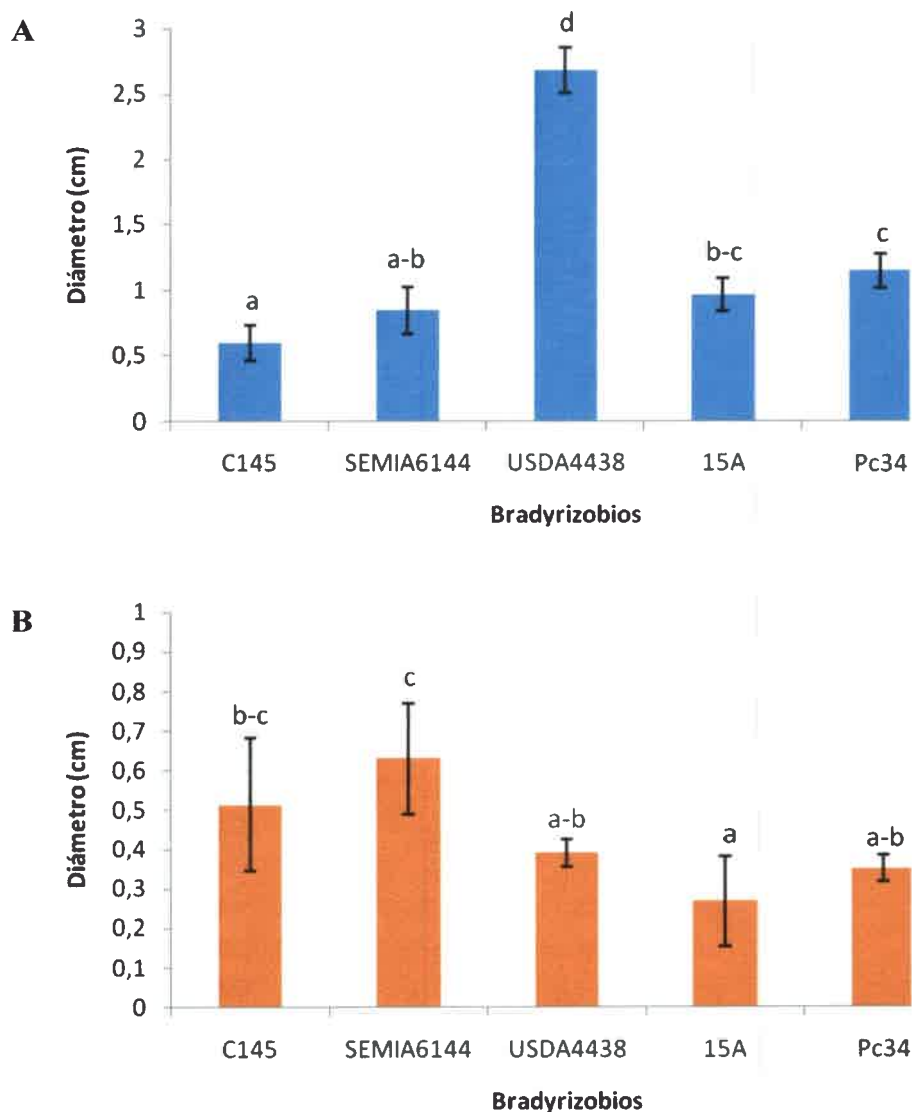


Figura 11 Movilidad de rizobios simbiotes de maní sobre agar-agua + 10% de YEM a temperatura subóptima de 23 °C. Las bacterias fueron crecidas previamente en medio YEM con agar al 1,5%. **A** medio agar agua 0,3% + 10% YEM y **B** medio agar agua 0,5% + 10% YEM. Los datos se corresponden a la media ± SD de 3 repeticiones independientes. ANOVA, test LSD Fisher, $p < 0,05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

Si comparamos la movilidad de los rizobios en medio agar agua al 0,3% + 10% YEM a 23 °C con la observada a 30 °C (figura 12A), podemos observar que en ambos casos la cepa de referencia USDA4438 sigue siendo la de mayor movilidad swimming. Es marcado el efecto de la temperatura sobre el swimming generando una disminución generalizado de cerca del 50% cuando el mismo se realizó al máximo valor de temperatura sub-óptima de inoculación.

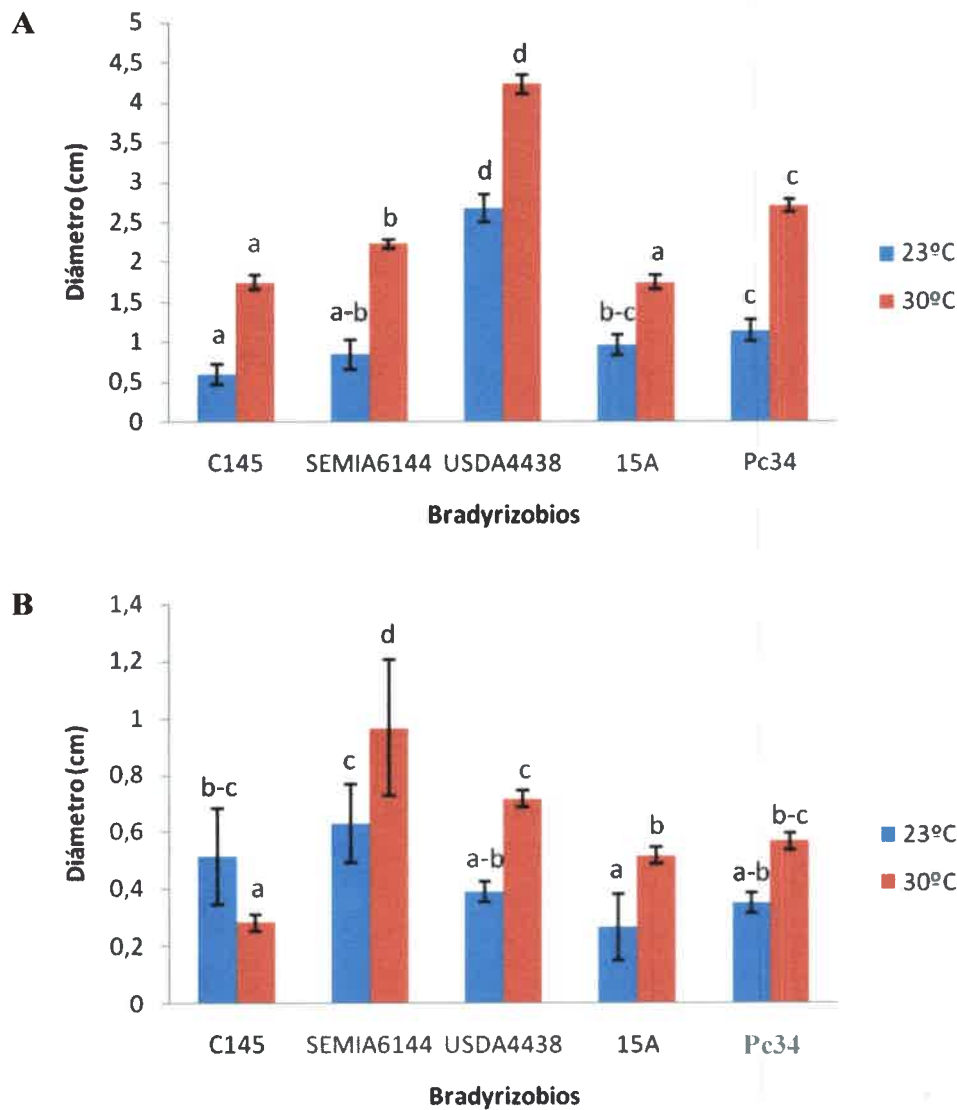


Figura 12 Movilidad de rizobios simbios de maní a 23 °C y 30 °C. Las bacterias fueron crecidas previamente en medio YEM con agar al 1,5% durante 8 días. **A** medio agar agua 0,3% + 10% YEM y **B** medio agar agua 0,5% + 10% YEM. Los datos se corresponden a la media ± SD de 3 repeticiones independientes. ANOVA, test LSD Fisher, $p < 0,05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

Al analizar los resultados obtenidos de swarming (figura 12B), podemos observar que las cepas de referencia SEMIA6144 presentó los mayores valores de movilidad a 23 °C. Comparando los resultados obtenidos en ambas temperaturas, apreciamos nuevamente el efecto negativo que genera la temperatura sobre la movilidad, a excepción del rizobio C145 el cual mostró mayor swarming a 23 °C.

4.3.2 Ensayo de movilidad tipo swimming y swarming a diferentes tiempos de incubación

Los rizobios seleccionados para esta Tesis Doctoral presentan la particularidad de ser de crecimiento lento ($\mu=0,079$ UFC/ml h) con tiempos de generación que oscilan en 8,7 horas (datos no mostrados), sin presentar diferencias en los tiempos de generación, entre las diferentes cepas de rizobios nodulantes de maní seleccionados (Bogino y col. 2010). Esta particularidad podría ser un factor condicionante del comportamiento swimming y swarming que estas bacterias presentan, no solamente en estos experimentos sino también a campo. Con el fin de determinar si un aumento en el tiempo de incubación de las placas afectaba la movilidad swimming y swarming de los cinco rizobios se realizaron ensayos en un rango de tiempo entre 8 y 32 días. La selección de dicho intervalo se justificó en que 8 días es el tiempo de caracterización inicialmente estipulado para esta técnica (Bogino 2008). Por otro lado, a fin de poder discutir los resultados obtenidos con los escasos reportes bibliográficos vinculados a este tema, se estableció como tiempo máximo de incubación 32 días (Tambalo y col. 2010).

Los ensayos se realizaron como lo explica el apartado 3.8.3 de materiales y métodos, con la variable del tiempo de incubación, el cual fue de 8, 16, 24 y 32 días en cámara de cultivo a 30 °C. El medio de cultivo utilizado fue agar agua + 10% YEM con una concentración de agar del 0,3% para los ensayos de swimming y de 0,5% para los de swarming.

La movilidad tipo swimming es dependiente del tiempo de incubación (figura 13A) existiendo una relación directa entre el valor del diámetro de movilidad y el tiempo de incubación hasta los 24 días de estudio. A partir de esta fecha observamos mayores oscilaciones de los valores, las cuales podrían deberse a diferentes factores asociados a la genética de las cepas o a posibles modificaciones en el soporte en el cual se realizó el ensayo. Cuando se estudió el comportamiento de la movilidad swarming a diferentes tiempos (panel B), a diferencia de lo observado en swimming, el comportamiento no fue generalizado y la cepa de referencia C145 no mostró diferencia en sus diámetros a medida que los tiempos de incubación aumentaron. El resto de las cepas testeadas incrementaron los diámetros de movilidad a medida que los tiempos de ensayo fueron más largos, obteniendo los valores máximos a 32 días. La cepa de referencia USDA4438 obtuvo los mayores valores al igual que en swimming y la cepa de referencia C145 presentó los menores valores de movilidad.

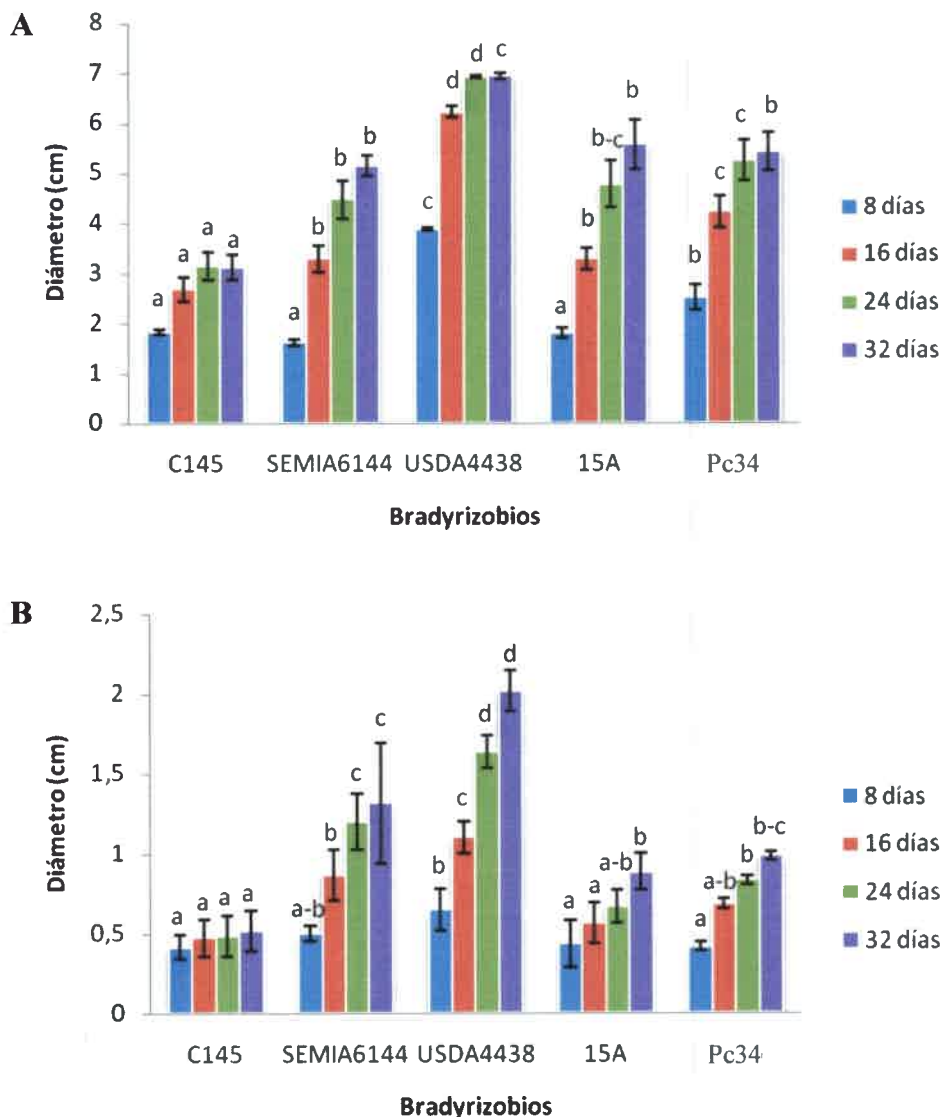


Figura 13 Movilidad de rizobios simbiotes de maní sobre agar agua + 10% YEM a 8, 16, 24 y 32 días de incubación. Las bacterias fueron crecidas previamente en medio YEM con agar al 1,5% durante 8 días. **A** medio agar agua 0,3% + 10% YEM y **B** medio agar agua 0,5% + 10% YEM. Los datos se corresponden a la media \pm SD de 3 repeticiones independientes. ANOVA, test LSD Fisher, $p < 0,05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

4.3.3 Ensayo de movilidad tipo swarming con diferentes fuentes de carbono

La rizósfera es un área en la cual existe una gran diversidad de moléculas producidas por las raíces de las plantas, algunas de las cuales pueden ser utilizadas como nutrientes por los microorganismos que en ellas habitan (Somers y col. 2004). Si consideramos que la inoculación de maní se recomienda realizar en el surco de siembra, dado que incrementa la

competitividad y la eficiencia de la FBN (Bogino y col. 2011), la movilidad bacteriana puede ser una característica de gran relevancia, así como su versatilidad para metabolizar diferentes fuentes de carbono. Todo esto le permitiría a la bacteria sobrevivir en el suelo y poder colonizar la rizósfera de raíces de maní. Para ello, a placas de agar agua 0,5% se les adicionó de forma independiente 4 monosacáridos (glucosa, fructosa, manosa y arabinosa) y 1 polialcohol (manitol) al 0,1%.

Al igual que lo observado por Tambalo y col. (2010), los rizobios simbiotes de maní aquí ensayados, presentaron diferencias en la movilidad swarming, cuando se los hizo crecer con diferentes fuentes de carbono. En el panel A de la figura 14 se puede observar el swarming de los 5 rizobios de estudio en presencia de glucosa, donde SEMIA6144 y la cepa nativa 15A presentaron los valores más altos de movilidad sin observarse diferencias significativas en el resto de los microorganismos. De igual manera que lo observado en el panel A, cuando se observó el efecto de la fructosa y manosa sobre el swarming (Panel B y C respectivamente) las cepas SEMIA6144 y 15A fueron nuevamente las de mayor movilidad. En el panel D se puede observar el comportamiento de las cinco cepas en estudio en el medio nutricionalmente deficiente agar agua con el agregado de arabinosa como única fuente de carbono, siendo la cepa SEMIA6144, la que presentó los mayores valores de movilidad swarming. Al utilizar manitol la cepa de referencia SEMIA6144 seguida de C145 fueron las más móviles (panel E).

En la figura 15 se encuentran graficados los valores de movilidad tipo swarming de cada cepa en estudio en las 5 condiciones ensayadas. Al analizar los resultados obtenidos de las cepas de manera conjunta, se observó que los mayores valores de movilidad se obtuvieron cuando la fuente de carbono fue arabinosa, dicho resultado se condice con los reportados por Covelli y col (2012) para *Bradyrhizobium japonicum*. Las bacterias C145 y SEMIA6144 presentaron valores similares a los obtenidos con arabinosa cuando se agregó manitol al medio base. Las cepas USDA4438 y Pc34 disminuyeron la movilidad de forma significativa cuando se utilizaron las otras fuentes de carbono, sin presentar diferencias. La cepa nativa 15A presentó valores similares a los obtenidos con arabinosa, con la fuente de carbono fructosa.

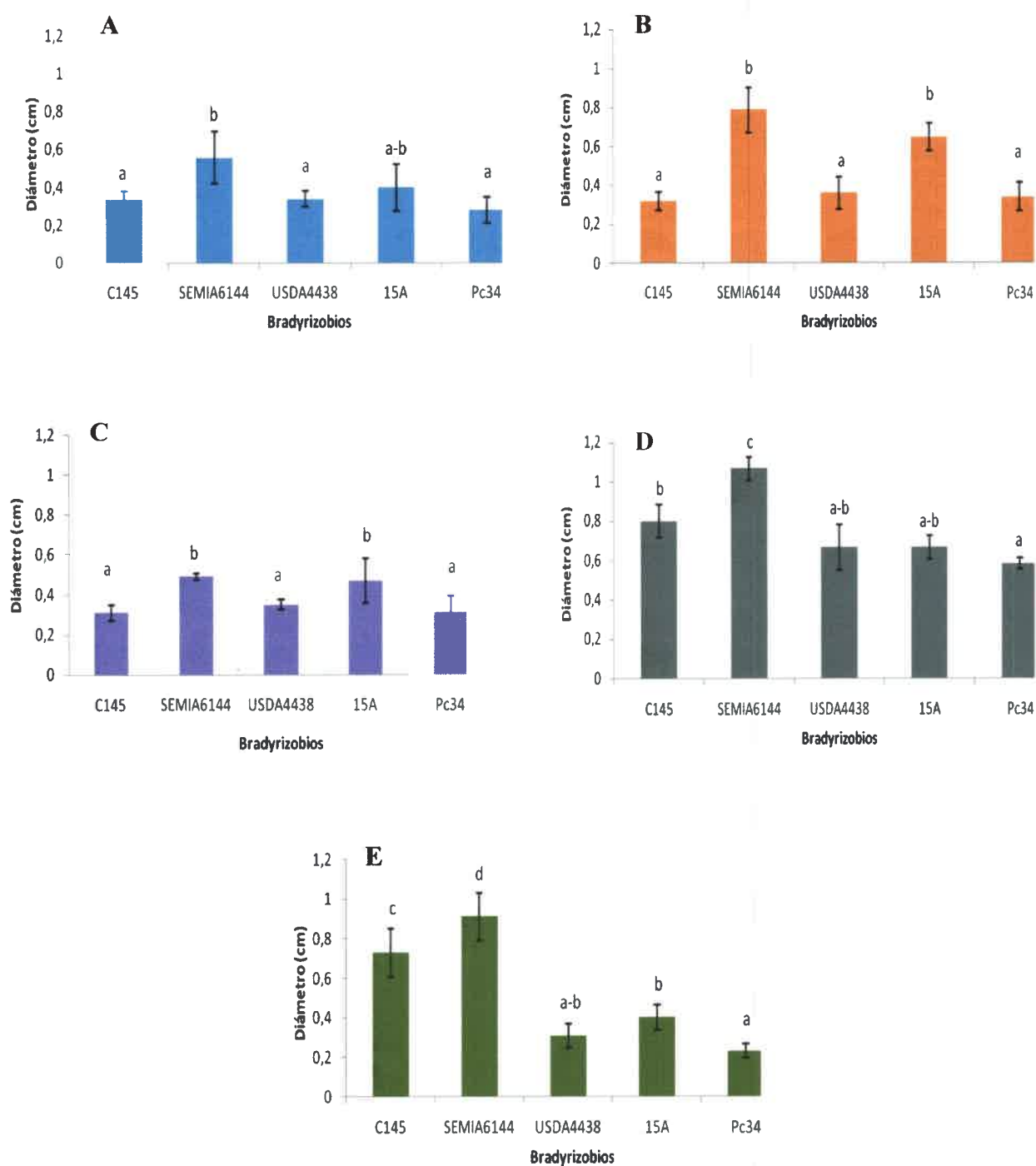


Figura 14 Movilidad swarming de rizobios simbiotes de maní sobre agar agua 0,5% + 0,1% de diferentes fuentes de carbono. Las bacterias previamente fueron crecidas en medio YEM al 1,5%. **A** medio agar agua 0,5% + 0,1% glucosa, **B** medio agar agua 0,5% + 0,1% fructosa, **C** medio agar agua 0,5% + 0,1% manosa, **D** medio agar agua 0,5% + 0,1% arabinosa y **E** medio agar agua 0,5% + 0,1% manitol. Los datos se corresponden a la media \pm SD de 3 repeticiones independientes. ANOVA, test LSD Fisher, $p < 0,05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

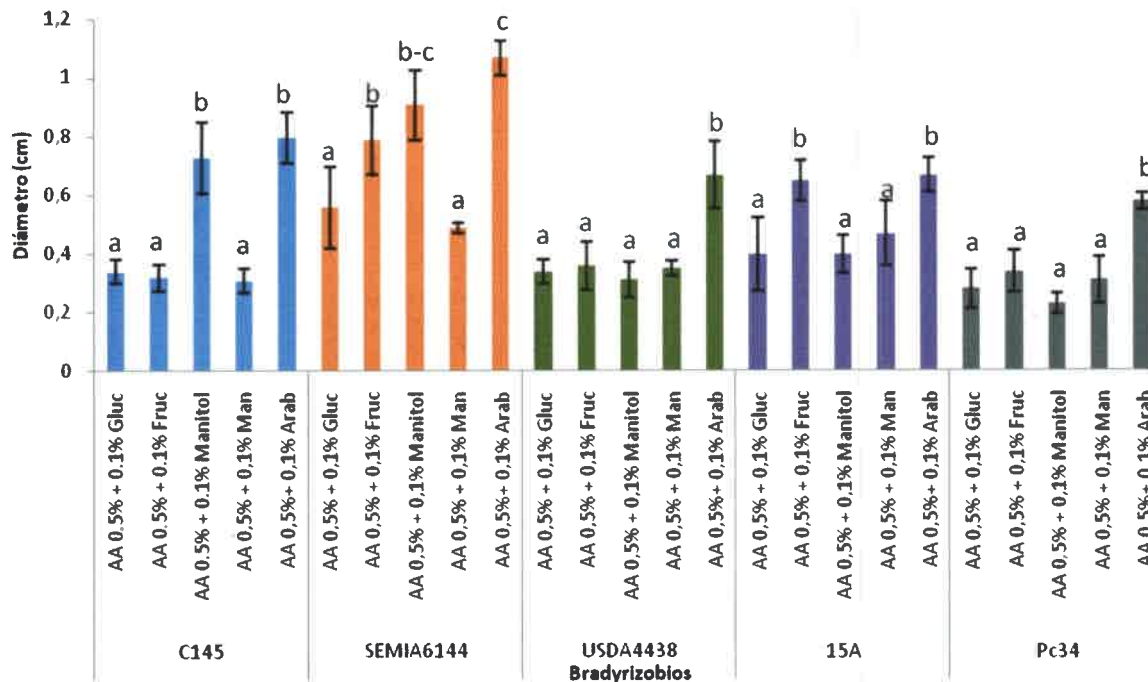


Figura 15 Movilidad swarming de rizobios simbiotes de maní sobre agar agua 0,5% + 0,1% de diferentes fuentes de carbono. Las bacterias previamente fueron crecidas en medio YEM al 1,5%. Los datos se corresponden a la media \pm SD de 3 repeticiones independientes. ANOVA, test LSD Fisher, $p < 0,05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

4.3.4 Efecto de exudados de semilla de maní sobre la movilidad swimming y swarming

El intercambio de señales entre los rizobios y las leguminosas ha sido definido como diálogo molecular, en el cual no solamente se necesita de la participación de diferentes moléculas sino también de una cercanía entre los diferentes interlocutores. Los rizobios responden a compuestos vegetales que estimulan su crecimiento y funcionan como quimioattractantes, pero muchos de los compuestos liberados por las semillas y raíces de las plantas tienen aun funciones desconocidas. A su vez los rizobios pueden responder frente a las semillas o las raíces produciendo compuestos reguladores del crecimiento de las plantas, moléculas reguladoras de *quorum sensing*, entre otras, con la finalidad de mantener un continuo diálogo molecular (Yaryura y col. 2008). En base a todo lo anteriormente referenciado se destacan tres aspectos importantes para esta Tesis Doctoral a saber: i) el tipo de inoculación que tiene la planta de maní, la cual se realiza en el surco, ii) la aquí demostrada capacidad de movilidad de diferentes simbiotes de maní y iii) los exiguos datos de composición de exudados del cultivo. Por lo tanto, si se requiere aplicar compuestos

biológicos para que la práctica del maní sea sustentable es necesario determinar si los exudados de semilla de maní tienen la capacidad de poner de manifiesto la movilidad de los rizobios y funcionar como quimioattractantes de los mismos.

El panel A de la figura 16 muestra los resultados de la movilidad tipo swimming de los rizobios nodulantes de maní, en medio agar agua 0,3% + 10% YEM con el agregado de 8 μ l de exudado de semilla concentrado 10 veces. Lo primero que se destaca es que en estas nuevas condiciones experimentales, todos los microorganismos mostraron swimming siendo USDA4438 la que presentó los mayores valores de movilidad, característica manifestada en todos los ensayos anteriormente realizados. Cuando la concentración de agar se incrementó al 0,5% para analizar el comportamiento swarming frente al exudado (Panel B), se observó una respuesta semejante a la obtenida en swimming.

Si se comparan los datos obtenidos en ambos tipos de movilidad con los registrados en los estudios controles sin exudado en el medio se puede observar que todos los resultados fueron menores. Estos registros menores pueden deberse por un lado a que la dosis de exudados empleada en el ensayo no sea la óptima para mostrar la máxima capacidad de movilidad o por el otro lado, a que posiblemente los exudados de semilla de maní presenten una variada composición molecular, donde uno o varios componentes ejerzan algún efecto regulatorio de la movilidad.

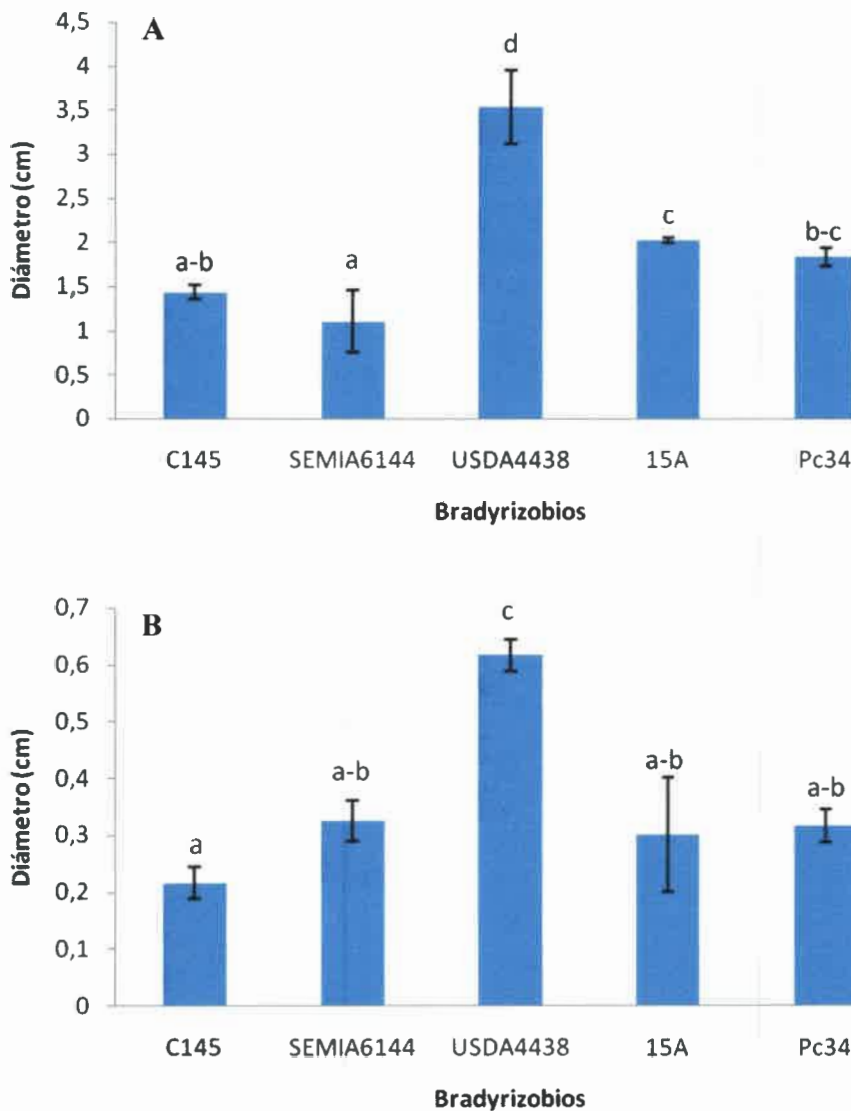


Figura 16 Movilidad swimming (A) y swarming (B) de rizobios simbiotes de maní sobre agar agua 0,3% y 0,5% respectivamente + 10% YEM con el agregado de 8 µl de exudados de semilla concentrado 10 veces. Las bacterias previamente fueron crecidas en medio YEM al 1,5%. Los datos se corresponden a la media ± SD de 3 repeticiones independientes. ANOVA, test LSD Fisher, $p < 0,05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

En la tabla 1 se observan los valores de radio de movilidad de las 5 cepas ensayadas hacia el exudado de semilla y hacia el medio control. A partir de la relativización de la movilidad hacia el exudado se calculó el porcentaje de movilidad swimming y swarming hacia los exudados de semilla de maní. Cuando el ensayo se realizó en medio agar agua 0,3% + 10% YEM, el comportamiento observado fue una atracción generalizada hacia los exudados, excepto por la cepa nativa Pc34 que no presentó modificaciones en el radio de movilidad (panel A). Cuando se analizó el efecto del exudado sobre la movilidad tipo

swarming (panel B), solamente la cepa nativa 15A, presentó un 25% mayor movilidad hacia los exudados de semilla.

Tabla 1 Relación porcentual de los radios de la movilidad tipo swimming (A) y swarming (B) hacia exudado de semillas de maní.

Swimming agar agua 0,3%+ 10% YEM (cm)				
A	Cepas	Sin exudado	Con exudado	%
	C145	0,65	0,78	20,5
	SEMIA6144	0,36	0,40	9,09
	USDA4438	1,66	1,86	12
	15A	0,91	1,11	21,81
	Pc34	0,93	0,93	0

Swarming agar agua 0,5%+ 10% YEM (cm)				
B	Cepas	Sin exudado	Con exudado	%
	C145	0,11	0,11	0
	SEMIA6144	0,10	0,10	0
	USDA4438	0,15	0,15	0
	15A	0,13	0,16	25
	Pc34	0,16	0,16	0

Volumen de exudado de maní: 8 μ l (concentrado 10 veces). Los valores se han obtenidos a partir de dos repeticiones independientes

4.4 Tamaño de células obtenidas de ensayos de movilidad tipo swarming

Acorde a lo detallado en el punto 1.9 de la introducción de este trabajo, diferentes géneros bacterianos tienen movilidad tipo swarming y mediante técnicas microscópicas es factible distinguir aquellas células que se han diferenciado a la forma swarm. Estudios de morfología y tamaño de células vegetativas y swarm de rizobios simbiotes de maní, fueron realizados utilizando microscopia electrónica de barrido (SEM). En base a los datos obtenidos, hemos podido determinar que los rizobios simbiotes de maní tienen la capacidad de diferenciarse a células swarm sin una homogeneidad en su longitud (figura 17). Nuestros resultados están en concordancia con los reportes bibliográficos de Harshey (1994), Fraser y Hughes (1999) y Verstraeten y col. (2008) quienes observaron un incremento significativo de la longitud de las células swarm en comparación con las células vegetativas de las cepas estudiadas por dichos autores. A diferencia del resto de los rizobios, la cepa C145, si bien evidenció su propiedad de diferenciarse en células swarm, los valores de longitud de éstas y

de las células vegetativas no mostraron diferencias significativas (figura 17), resultado similar al obtenido por Tambalo y col. (2010) para *R. leguminosarum*.

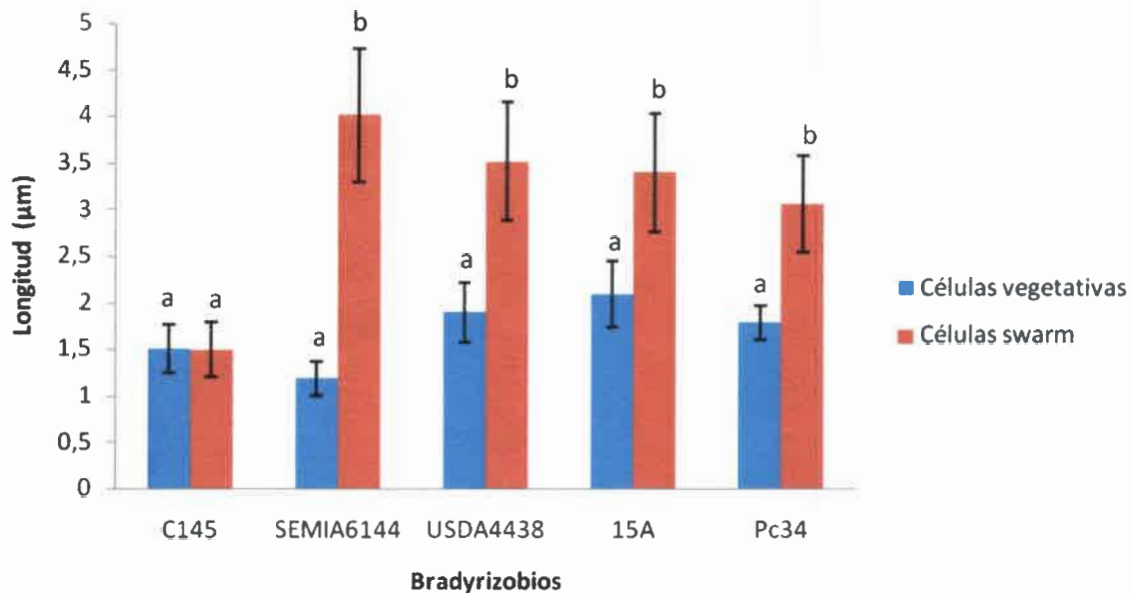


Figura 17 Longitud obtenida por SEM de células vegetativas y swarm de rizobios nodulantes de maní. Los datos se corresponden a la media \pm SD de 3 repeticiones independientes. ANOVA, test LSD Fisher, $p < 0,05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

En la figura 18 se muestran a modo de ejemplo, algunas fotografías obtenidas después de realizar SEM a células vegetativas y swarm de los rizobios en estudio. En las mismas se destacan, la cepa de referencia SEMIA6144 la cual presentó la mayor diferencia entre la longitud de las células vegetativas y las swarm (figura 18 panel C y D respectivamente) siendo estas últimas aproximadamente 3 veces más largas y la cepa C145 (figura 18 panel A y B) en la cual no se observan diferencias en la longitud pero si se manifiesta una modificación estructural de las células swarm, las cuales se encuentran unidas por los polos bacterianos.

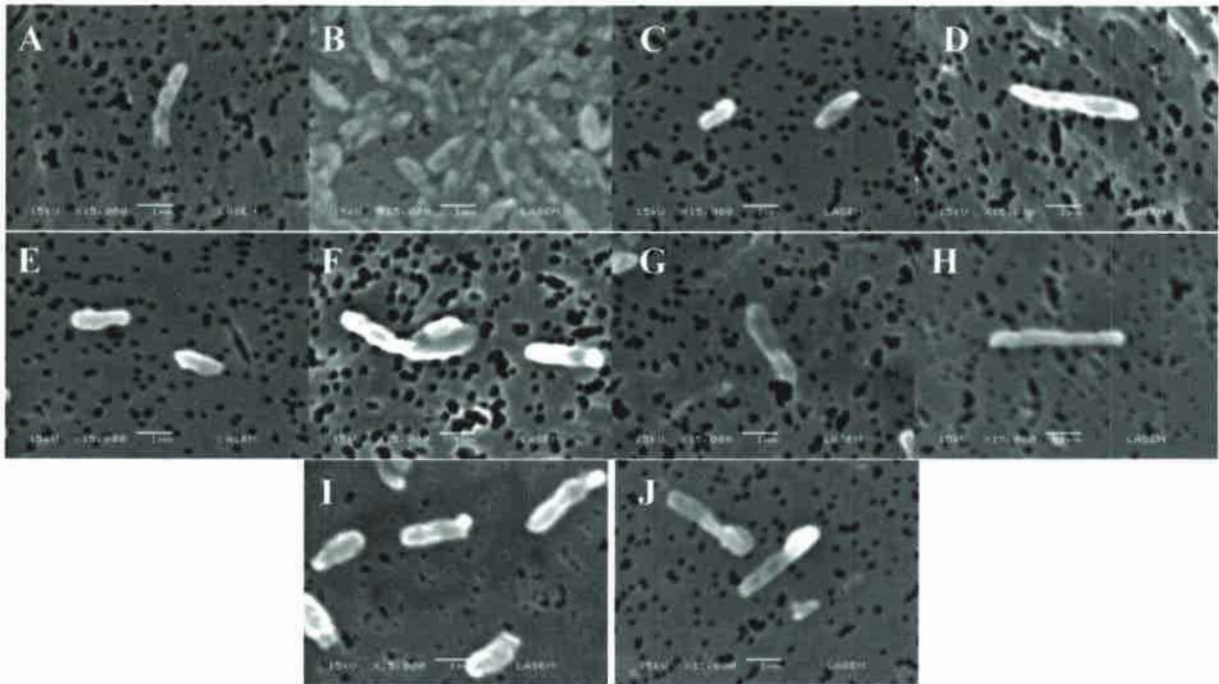


Figura 18 Fotografías de células vegetativas y swarm (tomadas del frente del halo de movilidad) de rizobios simbiotes de maní. **A** C145 células vegetativas, **B** C145 células swarm, **C** SEMIA6144 células vegetativas, **D** SEMIA6144 células swarm, **E** USDA4438 células vegetativas, **F** USDA4438 células swarm, **G** 15A células vegetativas, **H** 15A células swarm, **I** Pc34 células vegetativas y **J** Pc34 células swarm. Escala= 1 μ m.

En resumen, el comportamiento de los rizobios de estudio aislados de diferentes zonas, incluso de nuestra región, mostraron tener una respuesta no homogénea en los aspectos vinculados a eventos tempranos de interacción, lo que indicaría una gran variación genética de los rizobios simbiotes de maní. Este factor sería altamente condicionante para el desarrollo de novedosos planteos de inoculación de maní, donde el estudio conjunto de la interacción planta-suelo-microorganismo se torna imprescindible puesto que los cambios que ocurran en alguno de los tres integrantes repercutirá en el resto del conjunto (Lynch 1990).

4.5 Efecto de agroquímicos sobre rizobios simbiotes de maní

De igual forma que para otros cultivos de importancia agrícola, diferentes productos químicos se aplican para lograr una producción exitosa de maní. Si bien el uso de los mismos permitiría un beneficio o una ganancia económica, otras consecuencias de carácter nocivo podrían ocurrir, como por ejemplo afectar la calidad y la diversidad microbiana de los suelos así como la señalización de la rizósfera entre diferentes rizobacterias y las raíces de los cultivo (Paulucci y col. 2011). Son escasos los estudios asociados a las consecuencias ambientales del

empleo de productos químicos sobre rizobacterias y de cómo estos pueden afectar las envolturas celulares, la capacidad de supervivencia, la competitividad, entre otras características. Es nuestro interés, por lo tanto, conocer si la supervivencia y la movilidad bacteriana se ven afectadas en presencia de agroquímicos a dosis de campo y si dicha respuesta se puede asociar al patrón de lípidos que las bacterias presenten luego de ser tratados químicamente. Los fungicidas empleados para los ensayos fueron Carboxin 20 % + Tiram 20 % (MT) a una dosis de 200 ml/100 Kg semilla y Fludioxonil 2,5%+ Metalaxil 1% (FM) a una dosis de 100 cm³/100 kg de semilla.

4.5.1 Efecto fungicidas sobre la viabilidad de los rizobios de estudio

Se evaluó el efecto de MT y FM sobre el crecimiento de los rizobios en estudio, en medio líquido y en medio sólido. Los ensayos se realizaron en las mismas condiciones y medios de cultivo que se utilizaron para el crecimiento de las bacterias (según apartado materiales y métodos 3.3), con el agregado de MT y FM al 0,2% y 0,1%, respectivamente, las cuales corresponden a las concentraciones utilizadas en el campo.

Se observó ausencia de células viables en alícuotas tomadas de medios de cultivos con el agregado de MT al 0,2%, lo que indicaría un efecto letal de este producto comercial sobre la viabilidad de los rizobios de maní, resultado que incluso se obtuvo cuando la experiencia se realizó con el agregado de 0,1% del agroquímico (datos no mostrados). Con la adición de FM al 0,1%, no se observó diferencia alguna en el recuento de viables comparado con el medio de control, los cuales oscilaron en el orden de 10^{10} UFC/ml (D.O.600 nm 1). Cuando se estudió el efecto sobre el crecimiento en medios sólidos, se pudo observar inhibición del desarrollo de colonias por parte de MT, sin presentarse efectos sobre el crecimiento de rizobios por parte de FM.

A modo de ejemplo en la figura 19 se puede observar como se ve modificado el crecimiento de los rizobios, frente al agregado de estos productos comerciales evaluados.

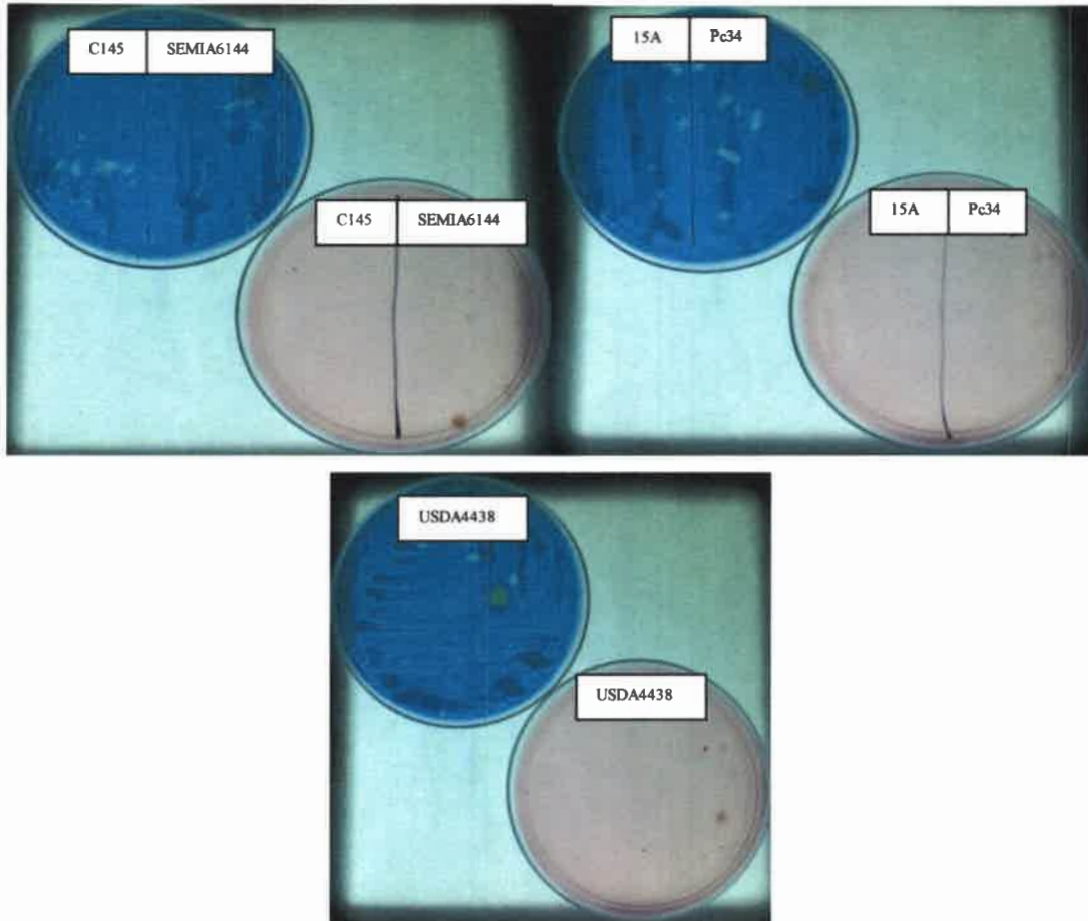


Figura 19 Crecimiento de los rizobios de estudio en medio YEM al 1,5% con el agregado de 0,2% de MT (placa roja) y 0,1% de FM (placa azul).

4.5.2 Efecto de los fungicidas sobre la movilidad

De manera similar a lo realizado en los ensayos de viabilidad, se procedió a estudiar de qué manera afectan los dos productos químicos comerciales la movilidad tipo swimming y swarming de los rizobios en estudio. Los ensayos de movilidad se realizaron de acuerdo a lo descrito en el apartado 3.8.3 de materiales y métodos con la diferencia que se les agregó MT y FM a una concentración del 0,2 y 0,1% respectivamente.

Al evaluar la movilidad tipo swimming y swarming en presencia de MT al 0,2%, no se observó crecimiento ni movilidad para ninguna de las cepas ensayadas (figura 20).

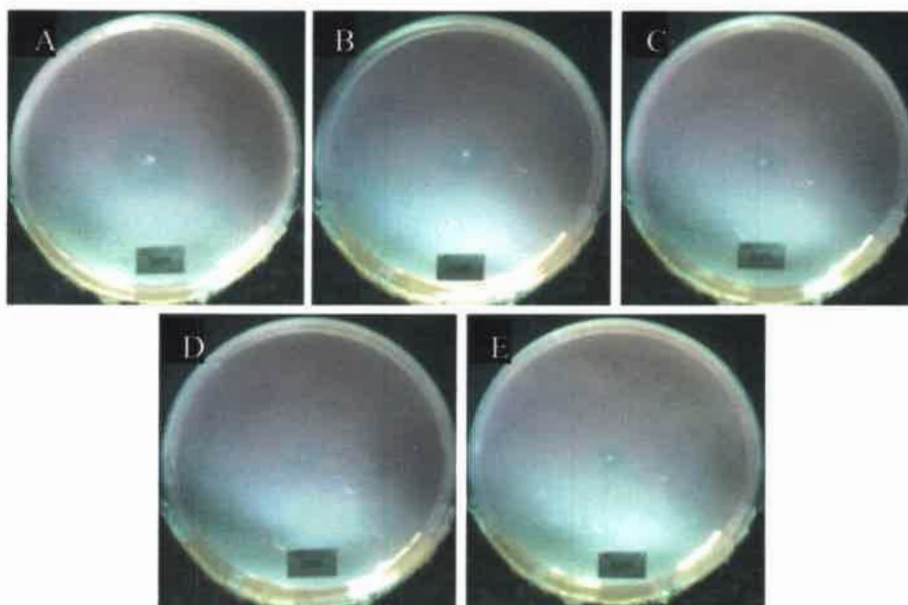


Figura 20 Movilidad swimming de rizobios simbios de maní sobre agar agua 0,3% + 10% YEM +0,2% de MT. Las bacterias previamente fueron crecidas en medio YEM al 1,5%. **A** C145, **B** SEMIA6144, **C** USDA4438, **D** 15A, **E** Pc34.

De igual manera que con el fungicida MT, se realizaron ensayos de swimming y swarming con el agregado de FM a una concentración de 0,1%. Al medir los diámetros de movilidad luego de 8 días de incubación a 30 °C, se pudo observar que las bacterias no generaban un halo de movilidad sino más bien un deslizamiento hacia el extremo de la placa, dicho comportamiento se pudo divisar a ambas concentraciones de agar (figura 21). Se realizaron diversos estudios a fin de encontrar la causa de este comportamiento en la movilidad y se determinó que el fungicida afecta la capacidad de solidificación del agar. Estos resultados han dificultado el análisis de los datos obtenidos y de la comparación de los mismos con las condiciones controles de movilidad.

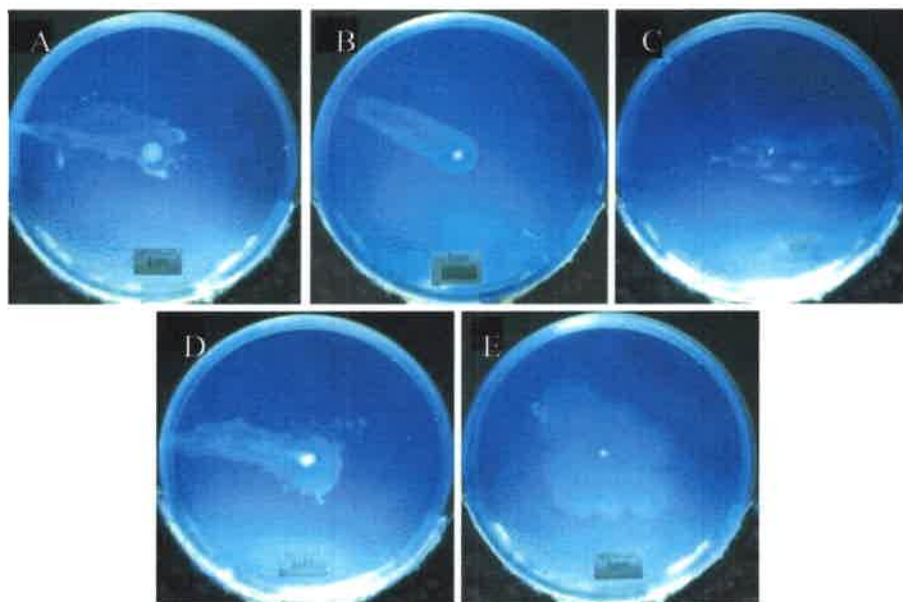


Figura 21 Movilidad swimming de rizobios simbioses de maní sobre agar agua 0,3% +10% YEM + 0,1% de FM. Las bacterias previamente fueron crecidas en medio YEM al 1,5%. **A** C145, **B** SEMIA6144, **C** USDA4438, **D** 15A, **E** Pc34.

El análisis conjunto de los datos obtenidos de supervivencia y movilidad bacteriana nos permite indicar que el fungicida MT tiene un efecto nocivo sobre los 5 rizobios simbioses de maní, a diferencia de FM que permitió obtener datos de crecimiento y viabilidad los cuales no difirieron de las condiciones control (sin FM). La comparación de movilidad swimming y swarming en presencia o ausencia de agroquímicos se vio afectada por impedir el crecimiento bacteriano (MT) o bien por la dificultad en solidificar el agar en las concentraciones de 0,3% y 0,5% (FM).

4.5.3 Efecto de fungicidas sobre la composición lipídica de los rizobios de estudio

Como se ha podido observar existe una respuesta dispar del crecimiento de las bacterias en presencia de los agroquímicos MT y FM. Por lo tanto, para poder establecer el papel que los lípidos puedan tener en la supervivencia y la movilidad en un ambiente químicamente adverso fue necesario realizar un nuevo planteo de crecimiento y acción de los fungicidas.

Cada rizobio fue crecido en medio YEM y cuando se alcanzó una D.O. 600 nm de 0,6 (10^8 UFC/ml) el cultivo se dividió en 3 partes iguales: la primer porción fue utilizada como la condición control, a la segunda fracción se le agregó MT a una concentración de 0,2% (dosis de campo) y a la última parte se le adicionó FM al 0,1% (dosis de campo). Cada uno de estos

tratamientos se dejó creciendo 24 horas en agitador orbital a 30 °C y 150 rpm. Posteriormente, se procedió a la centrifugación de los cultivos para el análisis de lípidos celulares, según se detalla en el punto 3.10 de materiales y métodos. Estas modificaciones metodológicas han permitido no solo la obtención de una biomasa necesaria para el estudio de los lípidos, sino un tiempo de contacto entre las bacterias y los agroquímicos suficientes para evidenciar algún cambio en la composición de lípidos bacterianos. De las cepas de estudio, el análisis del perfil de ácidos grasos no fue realizado sobre la cepa de referencia USDA4438 a causa de la alta variabilidad de datos obtenidos, lo que impidió realizar el análisis correspondiente y comparativo con las otras cepas bacterianas.

Los picos mayoritarios que se encontraron en todas las condiciones y cepas ensayadas fueron el AG saturado palmítico (16:0) y el AG insaturado cis-vaccénico (18:1 Δ 11). El comportamiento no fue homogéneo en las diversas cepas y la bacteria de referencia utilizada en Argentina (C145) solamente modificó su composición lipídica cuando fue expuesta a FM, en comparación con las células del ensayo control, donde se observó un aumento (18%) de la concentración del AG saturado palmítico (16:0) y una disminución (4,6%) del AG insaturado cis-vaccénico (18:1 Δ 11) (tabla 2). Cuando las células fueron expuestas a MT, no se registraron cambios estadísticamente significativos en ninguno de los dos AG mencionados anteriormente. La cepa SEMIA6144 no evidenció cambio alguno en los AG detectados en presencia de los fungicidas ensayados. Este comportamiento variable también fue observado sobre las cepas nativas de bradyrizobios, donde la cepa 15A no presentó cambios en la composición lipídica en presencia de los dos fungicidas, mientras que Pc34 modificó su perfil lipídico cuando se lo expuso a MT (tabla 2), observándose una disminución del 25% en la concentración del AG palmítico (16:0) y un aumento del 8% del AG cis-vaccénico (18:1 Δ 11).

La composición de AG de los diferentes bradyrizobios evaluados en la condición control concuerda con lo descrito por Paulucci y col. (2011), quienes detectaron diversos AG en simbioses de maní y diferente grado de insaturación cuando fueron sometidos a estrés salino. En nuestro trabajo experimental, el comportamiento de las cepas ensayadas mostró no ser homogéneo en diversos aspectos, ya que no todas las bacterias fueron afectadas por los agroquímicos de igual forma.

Las dos cepas sensibles a los fungicidas fueron C145 y Pc34. Siendo C145 sensible a FM, mostrando una modificación en la concentración de los dos AG medidos, con un



aumento del AG saturado palmítico (16:0) y una disminución del AG insaturado cis-vaccénico (18:1 Δ 11) con la consecuente disminución de la relación I/S (AG insaturados/saturados). Por otro lado, la cepa nativa Pc34, cuando fue expuesta a MT, modificó de forma opuesta a C145 su composición de AG, aumentando la concentración del AG saturado y disminuyendo la del insaturado, de esta manera se observó un aumento de la relación I/S (tabla 2).

Los resultados obtenidos en cuanto a la composición de AG de diferentes cepas de *Bradyrhizobium* expuestas 24 h a dosis utilizada a campo de los fungicidas MT y FM, indicarían que las cepas utilizan como mecanismo adaptativo para soportar este tipo de situaciones, un cambio en el grado de insaturación de los AG componentes de los fosfolípidos, para mantener las propiedades biológicas de la membrana que garanticen la viabilidad y funcionalidad celular. Los cambios en la composición de AG frente a estreses ambientales han sido descritos para varios organismos (Suutari y Laakso, 1994) y variaciones en el grado de insaturación de los AG como respuesta a modificaciones en las condiciones del medio ambiente, por ejemplo la temperatura, han sido informados por muchos autores para diversos microorganismos y pueden ser considerados como una respuesta adaptativa universal (Russell y Fukunaga, 1990; Suutari y Laakso, 1994).

Analizando todos los datos obtenidos vinculados al objetivo 2 de esta Tesis Doctoral podemos inferir que, en presencia de dos fungicidas utilizados en el cultivo de maní en nuestra región a valores de dosis de campo, se observa una respuesta diferencial en cuanto a la sensibilidad, crecimiento y viabilidad de los rizobios frente a los productos químicos. Esto podría implicar que su presencia tanto en la semilla como en el surco de siembra, afecte el valor de células viables necesario para lograr una interacción exitosa. Sumado a ello es factible que aquellas bacterias que puedan tolerar el accionar de los productos químicos, al presentar modificaciones en la composición lipídica de sus membranas, tengan afectado distintos procesos tales como su diálogo molecular, la colonización y entrada a la raíz, entre otras, lo cual podría acarrear una fallida nodulación y en consecuencia se afecte el proceso de FBN del maní.

Tabla 2 Efecto de los fungicidas MT y FM sobre la composición de ácidos grasos de los lípidos de *Bradyrhizobium*.

Cepa	Condiciones de cultivo	Ácidos Grasos (%)		I/S
		16:00	18:1 Δ 11, Δ 9	
C145	Control	20,1 \pm 0,9	79,9 \pm 0,4	4
	MT	17,8 \pm 0,5	82,2 \pm 2,0	4,6
	FM	23,8 \pm 0,1*	76,2 \pm 0,1*	3,2
SEMIA6144	Control	21,4 \pm 0,5	78,4 \pm 0,8	3,7
	MT	18,1 \pm 0,2	81,8 \pm 1,4	4,5
	FM	19,2 \pm 1,4	80,7 \pm 1,4	4,2
15A	Control	24,1 \pm 5,6	75,9 \pm 4,0	3,1
	MT	22,7 \pm 4,6	77,3 \pm 1,1	3,4
	FM	20,1 \pm 3,8	79,9 \pm 2,3	4
Pc34	Control	24,7 \pm 1,0	75,2 \pm 2,5	3
	MT	18,5 \pm 1,8*	81,4 \pm 3,5*	4,4
	FM	21,6 \pm 0,1	78,3 \pm 1,1	3,6

Los datos se corresponden a la media \pm SD de 3 repeticiones independientes. ANOVA, test LSD Fisher, $p < 0,05$. * indica que las diferencias son estadísticamente significativas. I/S: relación AG insaturados/saturados.

4.6 Ensayos de co-inoculación de *Bradyrhizobium*-*Azospirillum* sobre maní

Numerosos trabajos vinculados a la inoculación de leguminosas han sido realizados con el empleo de un microorganismo. Sin embargo, en los últimos años adquirió importancia la inoculación mixta utilizando dos o más microorganismos (Dardanelli y col. 2008; Sanchez y col. 2014). La bacteria con capacidad de promover el crecimiento vegetal *Azospirillum*, es una rizobacteria fijadora de nitrógeno de vida libre y afecta de manera positiva a distintas leguminosas. Son escasos los reportes donde se informe de algún efecto de *Azospirillum* cuando está en presencia de raíces de maní y a su vez frente a un rizobio simbiote de la misma. Asimismo y considerando los datos bibliográficos reportados y los resultados previos aquí informados, existe una respuesta dispar por parte de los rizobios de maní en eventos asociados a la interacción temprana con maní como lo es la movilidad, la formación de biofilm, la quimiotaxis y la adhesión. Si a esta vasta respuesta se la vincula con los estudios de tolerancia y funcionalidad de componentes de la membrana a productos químicos, la

obtención de resultados que puedan orientarnos a una estrategia de biofertilización óptima se torna compleja.

Preponderando el papel que tienen las rizobacterias sobre los cultivos, la necesidad de producir combinaciones de microorganismos adecuadas para potenciar su papel beneficioso y el desafío a futuro de mayor producción de alimentos, hemos planteado como un objetivo de esta Tesis Doctoral determinar la influencia de la co-inoculación bradyrizobios-*Azospirillum* sobre parámetros de crecimiento y nodulación asociados al maní. Para el abordaje de este objetivo se han tomado como referencia los trabajos publicados por Dardanelli y col (2008, 2010), Star y col. (2012) y Volfson y col. (2013), que emplean diferentes combinaciones de rizobios y *Azospirillum* sobre poroto, soja y arveja.

4.6.1 Preparación del ensayo de co-inoculación en condición de invernadero

El experimento se llevó a cabo según lo indicado en el apartado 3.12 de materiales y métodos. Los rizobios empleados para este ensayo fueron los previamente utilizados en los estudios de movilidad. Las plantas de maní fueron inoculadas con un dosis de 10^9 UFC/ml (Dardanelli y col. 2009) y de 10^6 UFC/ml para *A. brasilense* Az39 (aislada y recomendada por el INTA), según lo referenciado en Dardanelli y col. (2008). Luego de 32 días de ensayo las plantas fueron cosechadas y diferentes parámetros fisiológicos del crecimiento de las plantas fueron analizados, tal como se presentan a continuación.

4.6.1.1 Determinación de valores de longitud de tallo y raíz de plantas inoculadas

A los 32 días de ensayo las plantas de maní inoculadas con diferentes combinaciones microbianas, fueron recolectadas y tratadas según el apartado 3.12 de materiales y métodos. Los valores del largo de tallo y raíz de cada planta tratada se muestran en la figura 22.

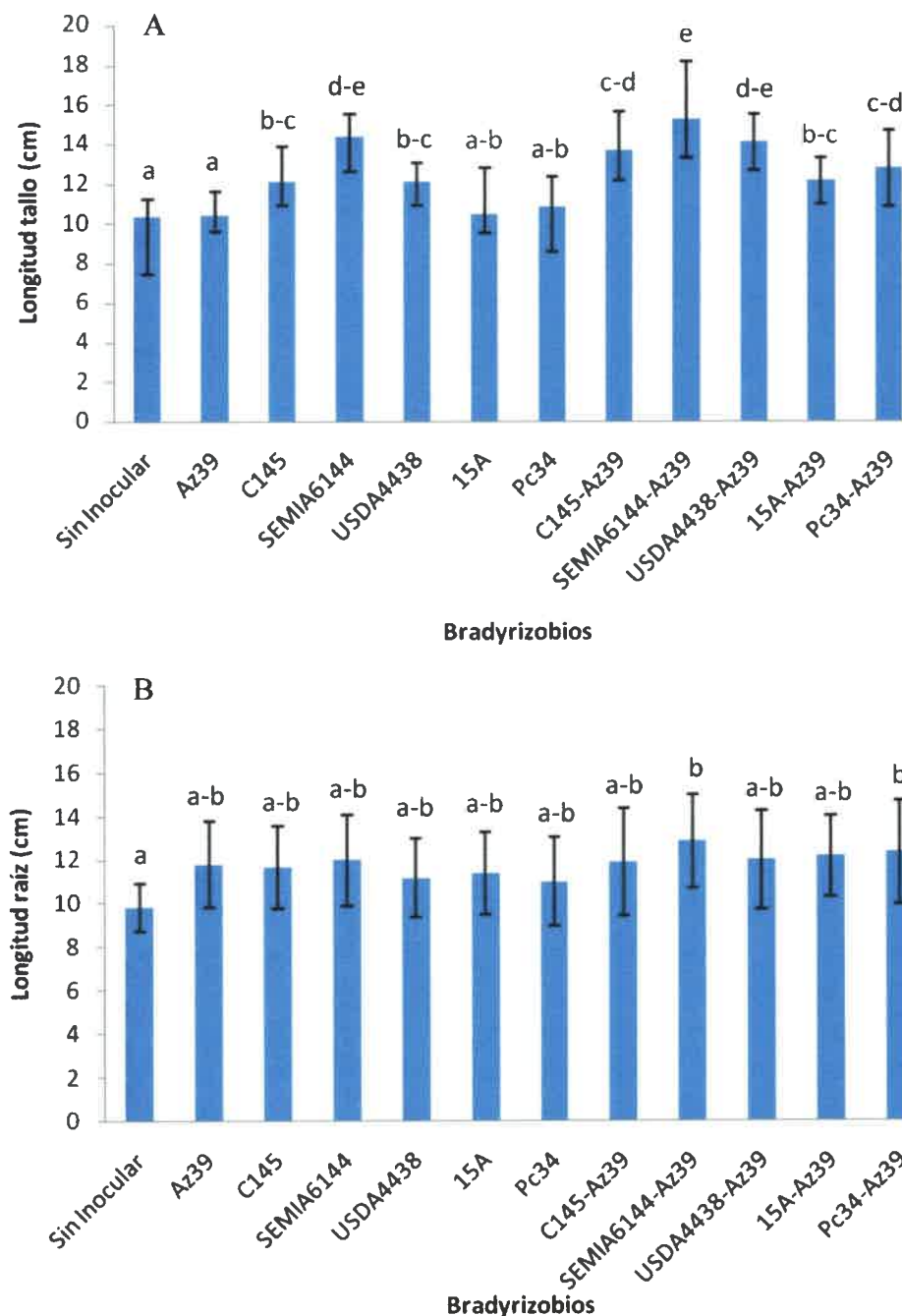


Figura 22 Efecto de la inoculación de bradyrizobios y *A. brasilense* Az39, sobre el largo de tallo (A) y de raíz (B) de plantas de maní de 32 días de crecimiento. Los datos se corresponden a la media \pm SD de 3 repeticiones duplicadas independientes. ANOVA, test LSD Fisher, $p < 0,05$. Letras diferentes en las barras indican que las diferencias son estadísticamente significativas.

El panel A muestra las diferencias en los valores de largo de los tallos de las plantas crecidas en las diversas condiciones de inoculación. Los resultados no fueron homogéneos y los tratamientos con mayores medidas fueron, el co-inoculado SEMIA6144-Az39,

SEMIA6144 y USDA4438-Az39. En todos los casos se observó un aumento en la longitud del tallo de los tratamientos co-inoculados comparados con las inoculaciones simples, aunque no siempre las diferencias fueron estadísticamente significativas. Todos los tratamientos a excepción de los inoculados con 15A y Pc34 presentaron diferencias con el control sin inocular y el inoculado únicamente con *A. brasilense* Az39. Cuando se analizó la longitud de raíz, que se encuentra graficada en el panel B de la figura 22, las diferencias entre el control sin inocular y los tratamientos inoculados fueron menores, resultando los co-inoculados Pc34-Az39 y SEMIA6144-Az39 los únicos tratamientos que presentaron diferencias.

4.6.1.2 Determinación de valores de peso seco de parte aérea y raíz de plantas inoculadas

Analizando en conjunto todos los resultados de peso seco de parte aérea (figura 23 panel A), podemos apreciar al comparar los datos con el control sin inocular, un efecto positivo de todas las inoculaciones a excepción de *A. brasilense* Az39. No se observó diferencias entre las co-inoculaciones y los tratamientos de inoculación simple, a excepción del valor obtenido por C145 que aumentó de forma significativa el peso de parte aérea cuando se co-inoculó. Dentro de las inoculaciones simples SEMIA6144 obtuvo los mayores valores sin presentar diferencias estadística con USDA4438 (figura 23 panel A). Si bien la disparidad entre las inoculaciones simples y las co-inoculaciones no fue estadísticamente significativa, se puede apreciar una tendencia de aumento en las medias de los pesos secos de parte aérea de todos los tratamientos co-inoculados. El efecto en el peso seco de las raíces no fue generalizado como en la parte aérea. Los tratamientos C145, USDA4438, Pc34 y SEMIA6144-Az39 no presentaron diferencias con el control sin inocular, los tratamientos que obtuvieron medias de peso seco de raíz superior a la del control, no presentaron diferencias entre ellos (figura 23 panel B).

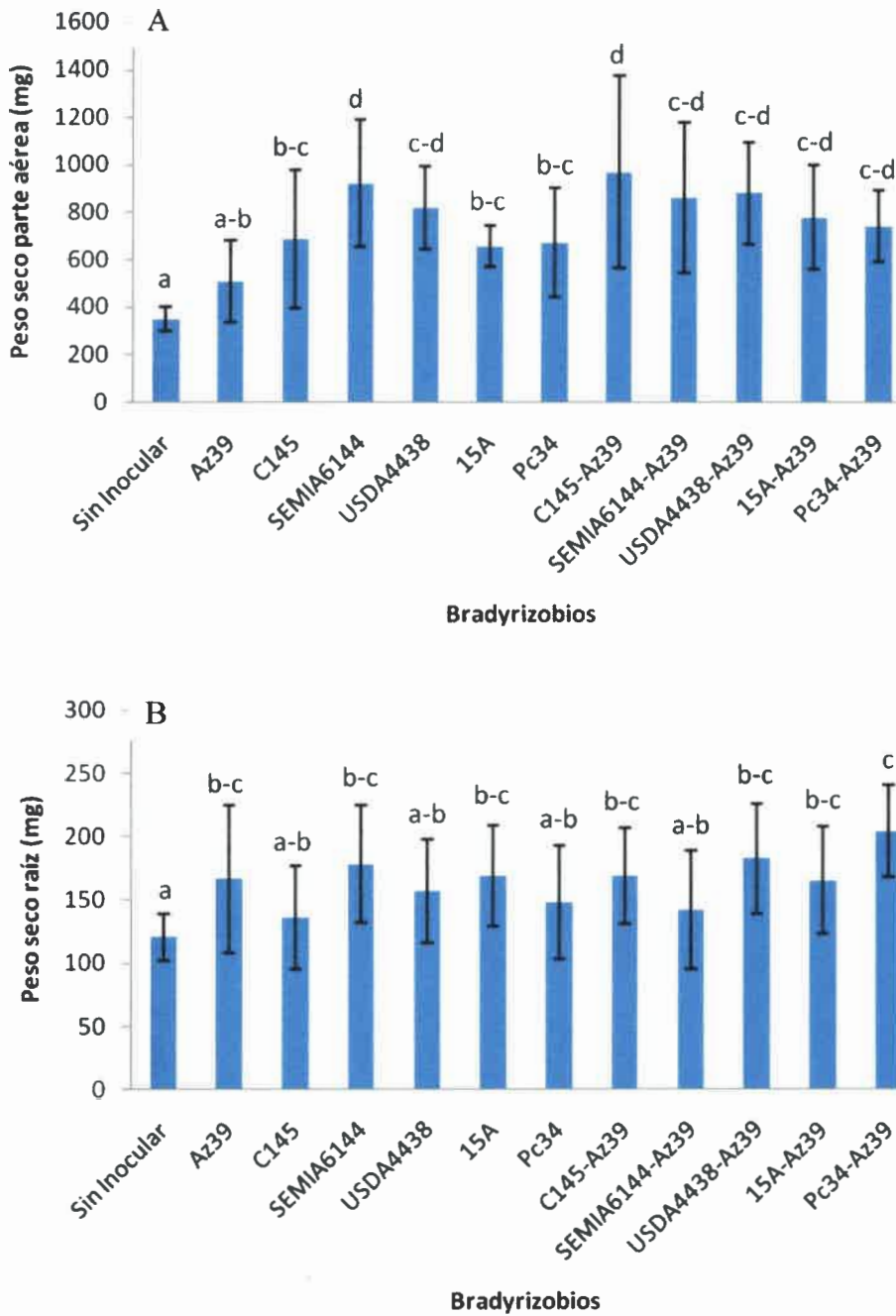
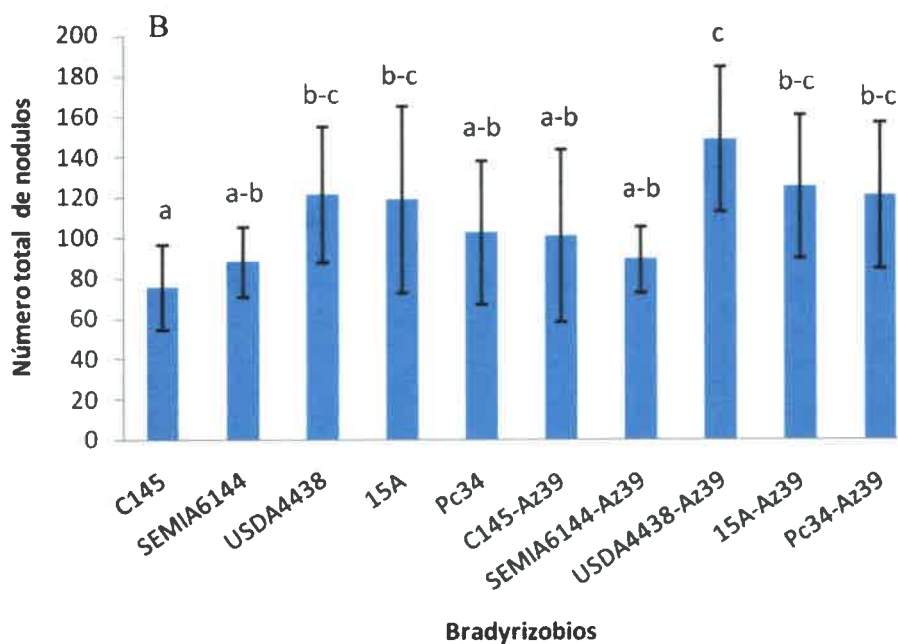
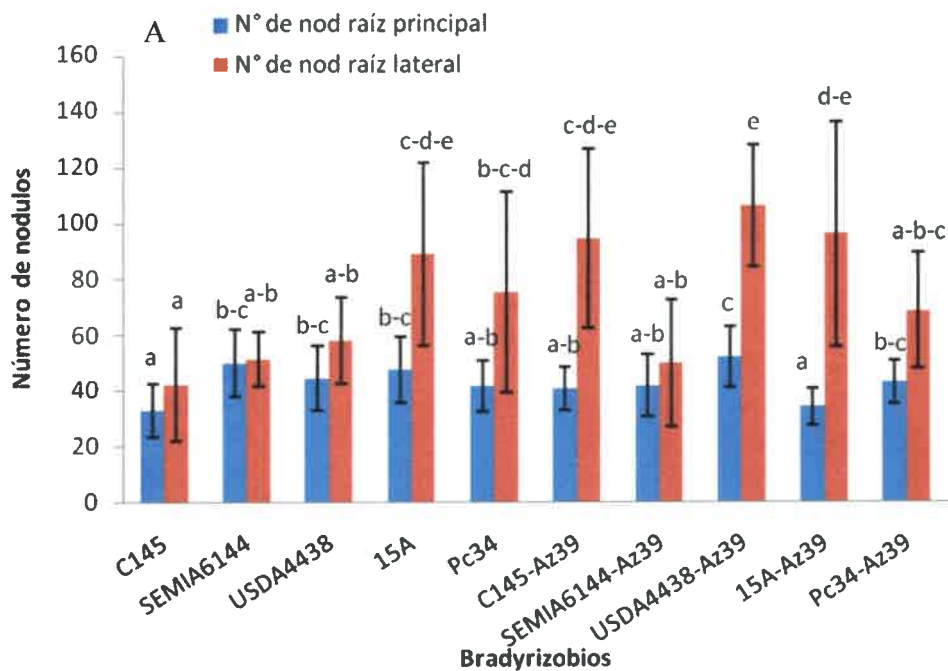


Figura 23 Efecto de la inoculación de rizobios y *A. brasilense* Az39, sobre el peso seco de parte aérea (A) y de raíz (B) de plantas de maní de 32 días de crecimiento. Los datos se corresponden a la media \pm SD de 3 repeticiones duplicadas independientes. ANOVA, test LSD Fisher, $p < 0,05$. Letras diferentes en las barras indican que las diferencias son significativas estadísticamente.

4.6.1.3 Determinación de parámetros de nodulación de plantas inoculadas

Al analizar el efecto de los tratamientos, sobre el número de nódulos presentes en la raíz principal (barras azules) de las plantas de maní, no se pudo observar un comportamiento homogéneo ni una respuesta generalizada de la co-inoculación (figura 24 panel A). Los tratamientos inoculados con las cepas SEMIA6144, USDA4438 y la nativa 15A generaron mayores valores que la inoculación simple con la cepa de referencia C145. Las co-inoculaciones no presentaron diferencias con las inoculaciones simples de sus respectivas cepas de bradyrizobios, a excepción de 15A la cual disminuyó el número de nódulos de forma estadísticamente significativa. La inoculación del maní influyó el número de nódulos de raíz lateral (barras rojas), presentando diferencias entre los tratamientos. En las inoculaciones simples, las cepas nativas (15A y Pc34) presentaron un número superior al de las cepas de referencia. El número de nódulos de los tratamientos co-inoculados de las cepas de referencia C145 y USDA4438 fueron similares al de la cepa nativa 15A sola o co-inoculada; SEMIA6144 y Pc34 no mostraron diferencia entre el inoculado simple y el co-inoculado. Al analizar el número total de nódulos de los diversos tratamientos (figura 24 panel B) la cepa de referencia USDA4438 y la nativa 15A presentaron un mayor número de nódulos que el tratamiento inoculado únicamente con la cepa recomendada por el INTA C145. Cuando se agregó a los inoculantes la bacteria *A.brasilense* Az39, si bien se registró un aumento en el número de nódulos, no fue estadísticamente significativa. Dentro de las co-inoculaciones USDA4438-Az39 fue la única que presentó diferencias con la cepa de referencia C145 co-inoculada.



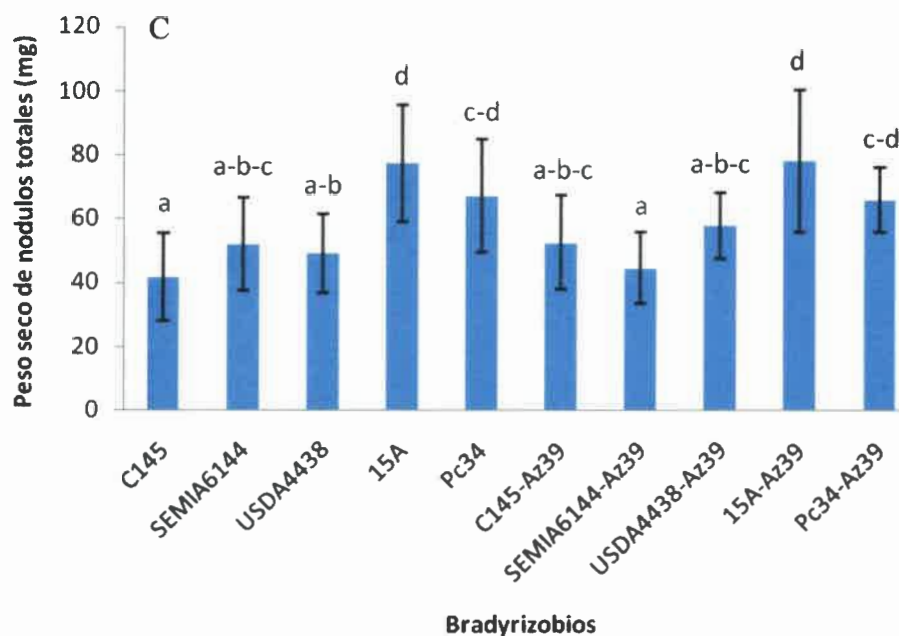


Figura 24 Efecto de la inoculación de bradyrizobios y *A. brasilense* Az39, sobre el número de nódulos de raíz principal y lateral (A), el número total de nódulos (B) y el peso seco de nódulos totales (C) por planta de maní de 32 días de crecimiento. Los datos se corresponden a la media \pm SD de 3 repeticiones duplicadas independientes. ANOVA, test LSD Fisher, $p < 0,05$. Letras diferentes en las barras indican que las diferencias son significativas estadísticamente.

Los valores de peso seco de nódulos de los tratamientos inoculados con las cepas nativas fueron superiores al de las cepas de referencia (figura 24 panel C). De igual manera que en los parámetros medidos anteriormente, la co-inoculación genera una tendencia de aumentar estos valores, aunque no siempre es estadísticamente significativa.

Los resultados de este ensayo muestran que de los dos rizobios nativos aislados por nuestro laboratorio, la cepa 15A mostró un efecto positivo e incluso superior a C145, cepa que el INTA recomienda para la inoculación del maní. Las co-inoculaciones en general marcaron una tendencia de mejora en los parámetros bajo estudio, los cuales no siempre fueron estadísticamente significativos debido a la variabilidad de los datos dentro de cada tratamiento. Esta variabilidad puede deberse al empleo de diferentes lotes de semillas, al soporte sobre el cual se realiza el ensayo, entre otros.

A modo de ejemplo en la figura 25 se pueden observar las diferencias de coloración, longitud y peso de las plantas inoculadas en comparación con el control sin inocular.



Figura 25 Efecto de las diferentes estrategias de inoculación sobre plantas de maní de 32 días de crecimiento, con las cepas de referencia de *Bradyrhizobium* C145 y *A. brasilense* Az39 en comparación con el control sin inocular.

4.6.1.4 Análisis estadístico multivariado de componentes principales

A los fines de situar las diferentes variables medidas en los ensayos de inoculación de invernadero en un marco que permita su explicación con mayor rigurosidad, se llevó a cabo un análisis estadístico multivariado de componentes principales.

El Análisis de Componentes Principales es una metodología multivariada que explica la estructura de varianza y covarianza mediante combinaciones lineales de las variables del sistema, reduciendo así el volumen de información. Geométricamente, las combinaciones lineales representan la selección de un nuevo sistema de coordenadas, obtenido por la rotación del sistema original, en el cual los ejes indican las direcciones con máxima variabilidad, dando una descripción más simplificada de la estructura de covarianza. Las componentes son aquellas combinaciones no correlacionadas cuyas varianzas son tan grandes como sea posible; cada componente sintetiza la máxima variación restante que poseen los datos, o sea, aquella

que no ha sido explicada por las anteriores componentes. Las componentes principales dependen solamente de la matriz de covarianza, o de la matriz de correlación, de las variables originales y su desarrollo no necesita un modelo estadístico para explicar la estructura probabilística de los errores, pero sí puede suponerse una distribución multinormal de la población (Di Rienzo y col. 2001; Balzarini 2003).

La finalidad de realizar el análisis de componentes principales para nuestra experiencia estuvo orientada principalmente a demostrar la influencia de las diferentes estrategias de inoculación sobre los parámetros de crecimiento y nodulación. En este sentido, se plantearon como observaciones o casos a los tratamientos de inoculación. Por otro lado se tuvieron en cuenta las variables relacionadas a parámetros de crecimiento (longitud y peso seco radicular y aéreo) y las vinculadas a parámetros de nodulación (número de nódulos y peso seco de los mismos).

La figura 26 muestra claramente la influencia de los tratamientos inoculados con respecto al control y a la inoculación simple con *A. brasilense* Az39. Se observó una agrupación de los tratamientos co-inoculados a excepción de SEMIA6144-Az39, las inoculaciones simples no presentaron una distribución homogénea y parecen contribuir en menor medida a los parámetros cuantificados respecto a las estrategias de co-inoculación.

En cuanto a la correlación entre variables, no se observaron correlaciones nulas o negativas, presentándose la mayor correlación entre el peso seco de nódulos totales y el número de nódulos de raíz lateral y totales. Los parámetros de nodulación se encontraron más relacionados con los pesos secos de parte aérea y raíz que con la longitud de tallo y raíz.

Se produjo un distanciamiento muy marcado de los tratamientos inoculados respecto al control sin inocular, dentro de los tratamientos de inoculación simple se destaca que el tratamiento con *A. brasilense* Az39 es el que menos impacta en los parámetros medidos, en comparación con el resto de los rizobios, sugiriendo que el N aportado por los rizobios es un parámetro nutricional clave para el desarrollo de la planta de maní

El análisis realizado permite explicar el 88% de la variabilidad total del ensayo, deducido de los valores estadísticos obtenidos para las componente principal 1 y 2 (PC1 y PC2).

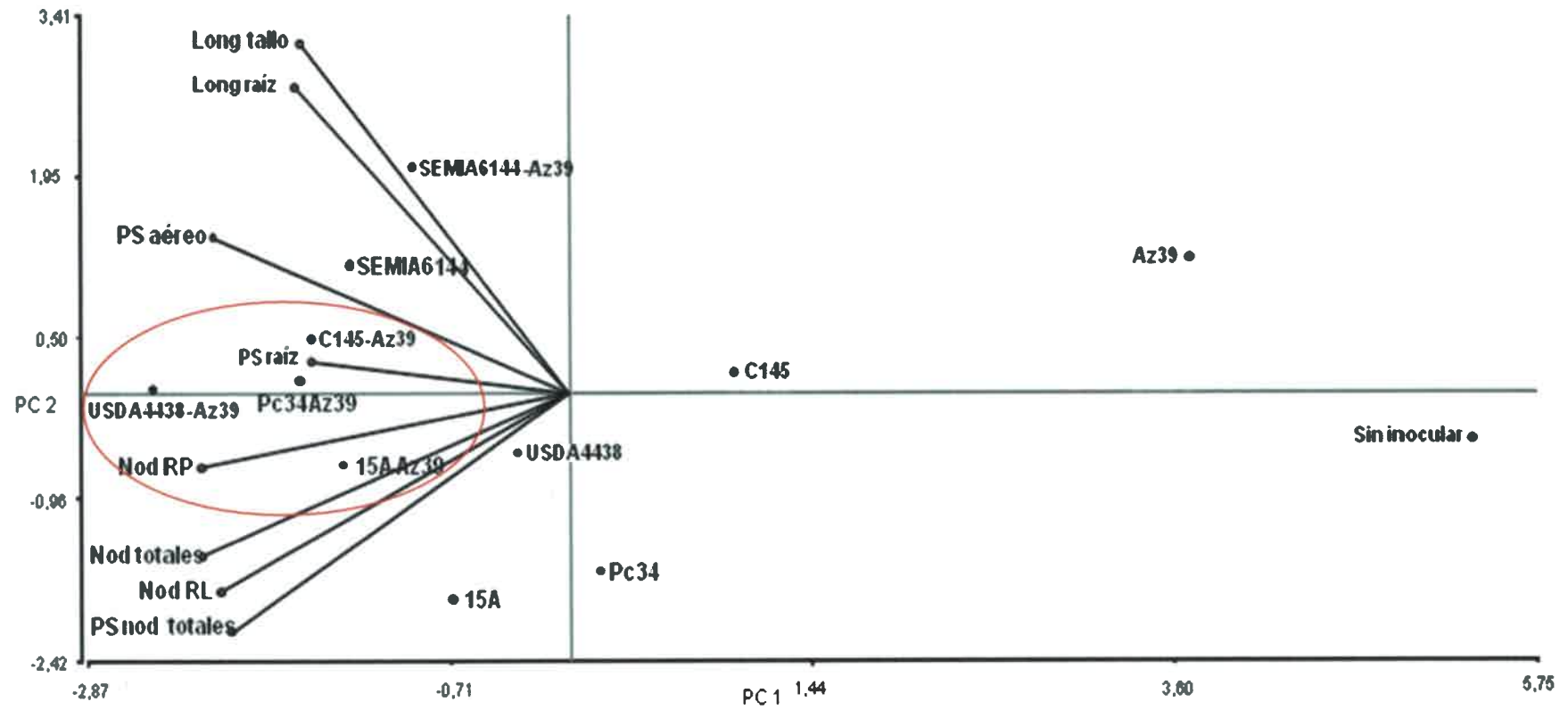


Figura 26 Gráfico bi-plot obtenido con el programa estadístico InfoStat versión 1.0. Las líneas rectas corresponden a la correlación obtenida entre las longitudes de tallo (Long tallo), longitud de raíz (Long raíz), peso seco parte aérea (PS aéreo), peso seco raíz (PS raíz), nódulos raíz principal (Nod RP), nódulos raíz lateral (Nod RL), peso seco de nódulos totales (PS nod totales) y número de nódulos totales (Nod totales). Los puntos aislados representan los diferentes tratamientos de inoculación aplicados. PC1: Componente principal 1, PC2: Componente principal 2.

En la década pasada, Vessey (2003) subrayó que la mayoría de los efectos beneficiosos de las cepas PGPRs utilizadas como biofertilizantes proceden de su influencia sobre la regulación del crecimiento vegetal, puesto que postuló que lo que ocurre esencialmente en estos casos es simplemente una modificación de la morfología y fisiología de la planta, como por ejemplo, cambios en la arquitectura de la raíz y pautas de asimilación. Este es el caso de las bacterias del género *Azospirillum*, definida como promotora del crecimiento vegetal por inducir el desarrollo radical de plantas leguminosas y no leguminosas, debido a la síntesis de fitohormonas que estimulan el crecimiento vegetal (Dobbelaere y col. 2001). Asimismo, es conocido que *Azospirillum* ejerce otro tipo de efectos sobre las plantas que dan lugar igualmente a una promoción del crecimiento de la misma, como es el caso del incremento del número y perfil de flavonoides presentes en los exudados, fenómeno demostrado previamente (Burdman y col. 1996; Dardanelli y col. 2008). Nuestros ensayos experimentales asociados a la interacción entre rizobios nativos o de referencia de maní en conjunto con *A. brasilense* Az39, indican que algunos de esos resultados previamente obtenidos por otros autores, podrían ocurrir en la interacción con maní. Por otra parte, cabe destacar el efecto del rizobio nativo 15A, que muestra un buen potencial como candidato a formulaciones comerciales a futuro, para el cultivo de esta leguminosa de alto impacto en nuestra región.

4.6.2 Ensayos a Campo

Marcados incrementos en el rendimiento de maní han sido logrados en base a buenas prácticas de inoculación con *Bradyrhizobium* sp. Sin embargo, este efecto fue observado en áreas cultivadas con maní por primera vez en la década del 70 (Walker y col. 1976).

La co-inoculación entre rizobios y *Azospirillum* o alguna otra PGPR ha mostrado incrementar significativamente el número total de nódulos de diversas leguminosas, actividad reductora de acetileno, contenido total de N y contenido de macro y micronutrientes, comparado con la inoculación simple con rizobios (Sarig y col. 1986; Burdman y col. 1998; Rodelas y col. 1996, 1999). No obstante, este aspecto no ha sido documentado para el cultivo de maní.

El hecho de introducir las cepas como inoculantes en el ecosistema suelo, permite hacer inferencias de mayor contundencia en cuanto a su contribución al desarrollo del cultivo de maní, dado que es en el suelo cuando la cepa se expone a las diversas condiciones

ambientales, compite con una población rizobiana firmemente establecida, interacciona con otros residentes habituales del ecosistema y es sometida a las influencias de las actividades de labranza humanas, tales como la aplicación de productos químicos. Es por ello que considerando la multiplicidad de factores que afectan la interacción rizobio leguminosa, se dispuso llevar a cabo la experiencia a campo.

4.6.2.1 Análisis químico de los suelos experimentales

Como punto de partida se realizaron análisis de suelo a los fines de conocer las condiciones que presentaban los campos experimentales y de este modo poder establecer alguna conexión con los resultados obtenidos en cada ensayo. Así, muestras de suelo de cada campo fueron analizadas obteniéndose los resultados mostrados en la tabla 3.

Tabla 3. Análisis de suelos experimentales.

	Chaján	Dalmasio Vélez Sarfield
Materia Orgánica (%)	1,93	2,10
Nitratos (ppm)	102,33	159,9
Fósforo (ppm)	26,5	42,70
pH	6,26	6,78

Datos informados por Laboratorio integral agropecuario Rio Cuarto

Los contenidos de nitrato, fósforo y particularmente materia orgánica, son variables dependientes del manejo de los suelos y están relacionados a la productividad de los mismos, por esto, son considerados como indicadores de la calidad de un suelo (Uberto y col. 2002). Los valores de estos tres parámetros en los suelos experimentales son considerados medios (Bohn y col. 1993) con excepción del valor de nitrato para ambos campos que es un valor de nitrato medio a alto.

Las plantas involucradas en procesos de FBN tienen mayores requerimientos de fósforo (Jungk 1998), esto se basa en las exigencias de ATP para el funcionamiento de la nitrogenasa y el fósforo necesario en la transducción de señales, biosíntesis de membrana y desarrollo y función del nódulo (Ribet y Drevon 1996; Al Niemi y col. 1997). Dada la amplia necesidad de este nutriente para la simbiosis es importante la disponibilidad del mismo en los suelos.

El contenido de materia orgánica del suelo no sólo provee de nutrientes, sino que además es el principal agente que promueve la formación y estabilidad de agregados del

suelo, contribuyendo al mantenimiento de su estructura y a la compartimentalización del espacio y distribución de los nutrientes (Brady y Weil 1999). Estas propiedades permiten que las cepas inoculadas tengan mayores posibilidades de supervivencia en los micronichos creados en estos tipos de suelos.

La acidez de un suelo es un factor importante para el crecimiento y desarrollo de los rizobios. Se ha comprobado que la supervivencia rizobiana puede ser afectada cuando el pH es inferior a 5,5 (Brockwell y col. 1991; Da y Deng 2003). Los valores de pH encontrados en los suelos experimentales presentan valores superiores a los considerados negativos.

4.6.2.2 Ensayo a campo, campaña 2010-2011

A fin de corroborar si nuevas estrategias de inoculación puedan ejercer un incremento significativo en la producción de maní, se decidió evaluar, si los resultados observados a nivel de invernadero con diversas combinaciones de cepas de referencia recomendadas por el INTA, podían reproducirse en el campo. Los tratamientos fueron: control sin inocular, inoculación simple con *A. brasilense* Az39, *Bradyrhizobium* C145 y el co-inoculado C145-Az39. Las dosis de inoculación fueron 1,5 l de inoculante por ha de C145 y 1 l de inoculante por ha de Az39. Los inoculantes comerciales (Nitrasoil) empleados contenían aproximadamente 1×10^9 UFC/ml. El ensayo se realizó en un campo experimental ubicado en la localidad cordobesa de Chaján ($33^{\circ}30'19.38''S$ $65^{\circ} 3'23.65''O$), el cual presenta historia previa de cultivo de maní. La dirección técnica estuvo a cargo del Ing. Guillermo Cerioni (Facultad de Agronomía y Veterinaria UNRC).

En la tabla 4 se puede observar que el mayor rendimiento expresado como peso de cajas por hectáreas se observó en el ensayo co-inoculado, donde se obtuvo 663 kg más de cajas por ha que el control sin inocular, lo que representa un aumento del rendimiento del cultivo del 18,9%. Si comparamos el rendimiento de la inoculación simple con la co-inoculación, el segundo tratamiento obtuvo 444 kg más de rinde que cuando se inoculó únicamente con C145.

Los resultados de este primer ensayo a nivel de campo nos permitieron conocer el comportamiento de este cultivo frente a la dosis de co-inoculación empleada y poder ahora emplear otras combinaciones en búsqueda de una mejor opción de biofertilización.

Tabla 4 Efecto de la inoculación de maní en el rendimiento de frutos (cajas). Los valores son expresados como $Kg\ ha^{-1}$

Tratamientos	Peso por hectárea	Diferencia con control	
	Kg	Kg	%
Sin inocular	3515		
Az39	3527	12,3	0,3
C145	3735	220,3	6,3
Co-inoculación	4179	663,8	18,9

Datos obtenidos de la cosecha de una superficie de 1 ha por tratamiento.

4.6.2.3 Ensayo a campo, campaña 2013-2014

El experimento se realizó en un campo ubicado en la localidad cordobesa de Dalmasio Vélez Sarfield (32° 34' 34'' S, 63° 36' 47'' O), que cuenta con historia previa de siembra de maní pero no de inoculación.

Tomando de referencia los datos preliminares del comportamiento de las mezclas de rizobacterias en invernadero (apartado 4.6.1) y de un ensayo a campo (apartado 4.6.2.2), se diseñó una serie de experiencias a los fines de evaluar la actividad de las cepas utilizadas como inoculantes en un medio dinámico e influenciado por múltiples factores. De acuerdo a los resultados de eficiencia obtenidos en el laboratorio se decidió comparar las cepas nativas 15A y Pc34 con la cepa C145 recomendada por el INTA, donde las mezclas de rizobacterias con Az39 se realizaron a las dosis detalladas en el punto 3.13 de materiales y métodos. Las valoraciones se efectuaron sobre plantas de 60 días de crecimiento y a cosecha, aproximadamente 150 días desde la siembra. En la figura 27 se puede observar la parcela experimental a los 60 días post siembra, en el cual se realizó el ensayo de inoculación.



Figura 27 Campo experimental ubicado en la localidad cordobesa de Dalmasio Vélez Sarfield 60 días post siembra.

4.6.2.3.1 Parámetros de crecimiento y nodulación de plantas de 60 días

Las figuras 28 y 29 muestran respectivamente los datos que se obtuvieron sobre los parámetros de crecimiento y nodulación de maní al inocular en forma simple o doble con las rizobacterias en estudio.

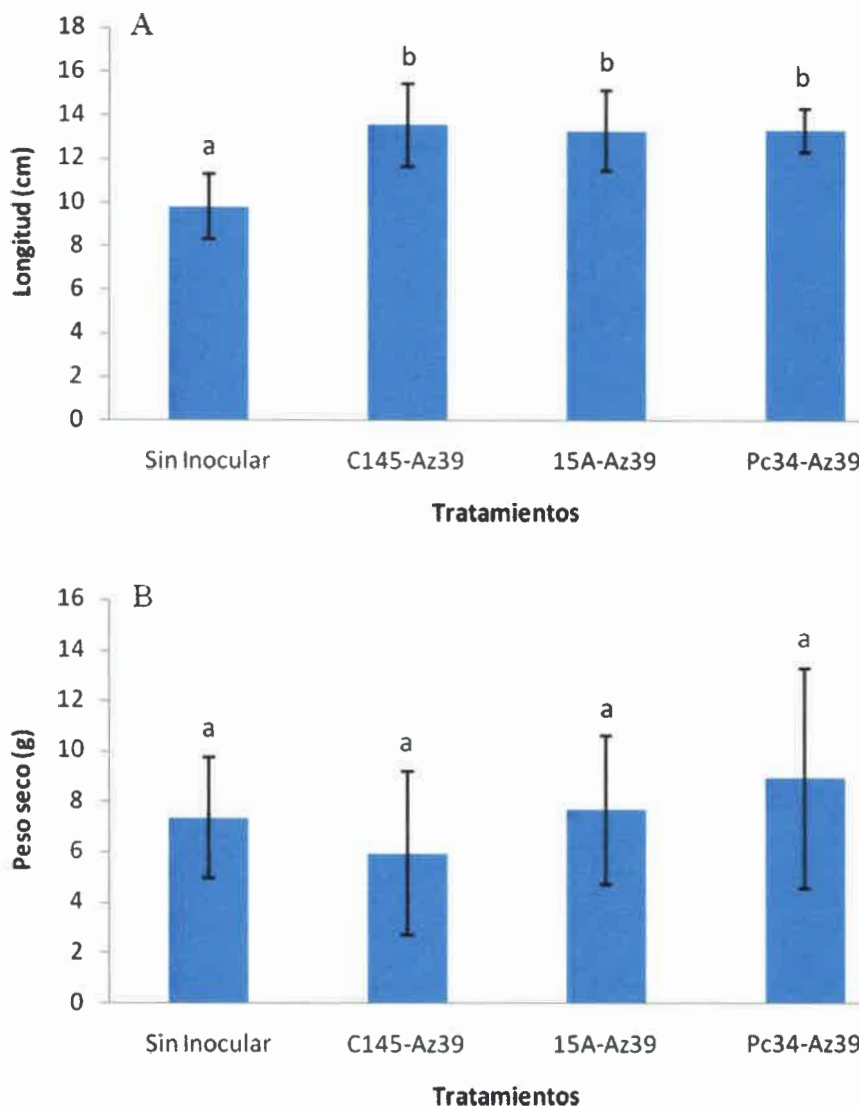


Figura 28 Efecto de la inoculación de bradyrizobios y *A. brasilense* Az39, sobre el largo de tallo (A) y peso seco de parte aérea (B). Los datos se corresponden a la media ± SD de 3 repeticiones independientes. ANOVA, test LSD Fisher, $p < 0,05$. Letras diferentes en las barras indican que las diferencias son estadísticamente significativas.

En general se observó un comportamiento uniforme de los datos en los tres tratamientos para la longitud del tallo (figura 28 panel A), presentándose diferencias significativas con el control pero no entre ellos. Cuando se analizó el peso seco de la parte aérea no hubo diferencias con el control (figura 28 panel B). Al analizar el número de nódulos de los tres tratamientos co-inoculados, no se registraron diferencias entre ellos, pero si con el control sin inocular (figura 29). Destacamos que las plantas del ensayo control si bien no fueron inoculados, presentaron nódulos los cuales han sido generados por interacción con cepas nativas del suelo. Por otro lado, el comportamiento de las mezclas de rizobacterias fue

diferente en los nódulos laterales presentando únicamente diferencias estadísticamente significativas con el control, el tratamiento Pc34-*A. brasilense* Az39 con un valor que triplicó al del control (datos no mostrados). Si evaluamos el comportamiento de los tratamientos en el número total de nódulos, las cepas nativas 15A y Pc34 presentaron mayores recuentos que el control, no siendo así para la cepa de referencia C145, la cual no obtuvo diferencias estadísticamente significativas con el control sin inocular (figura 29).

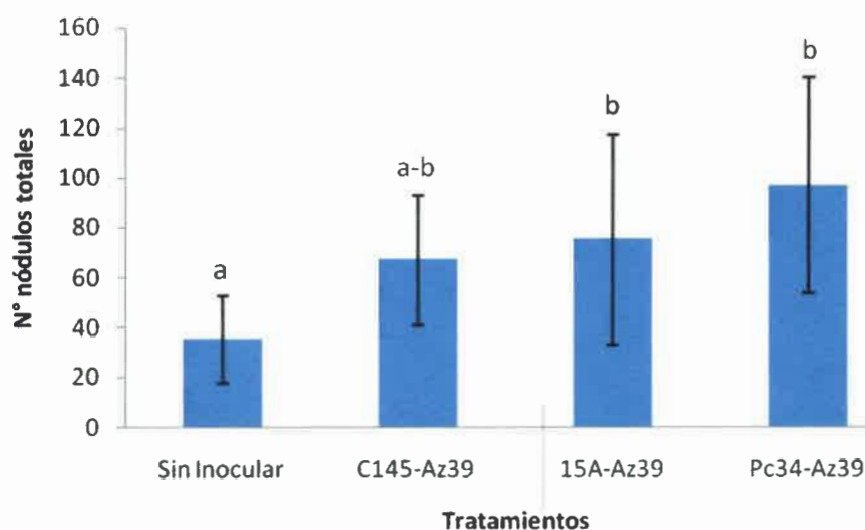


Figura 29 Efecto de la inoculación de bradyrizobios y *A. brasilense* Az39, sobre el número total de nódulos por planta. Los datos se corresponden a la media \pm SD de 3 repeticiones independientes. ANOVA, test LSD Fisher, $p < 0,05$. Letras diferentes en las barras indican que las diferencias son estadísticamente significativas.

4.6.2.3.2 Parámetros de crecimiento y nodulación de plantas a cosecha

A los 150 días de crecimiento de las plantas de maní en el campo, material vegetal recogido de una superficie de 1 m² fue cosechado y analizado para determinaciones de peso seco de parte aérea, número y peso seco de nódulos y peso seco de cajas (figura 30 y 31).

Se mantuvo la tendencia observada en los parámetros medidos a los 60 días, contemplándose una mayor valoración de los datos en el ensayo donde se empleó la cepa nativa 15A. Los resultados de peso seco de parte aérea se encuentran representados en la figura 30 (panel A), la que muestra que el tratamiento co-inoculado 15A-*A. brasilense* Az39 fue el único que presentó diferencias con el control, duplicando prácticamente el peso.

Al estudiar el efecto de los tratamientos sobre el número de nódulos presentes en la raíz principal, se evidenció que los tres tratamientos presentaron diferencias con el control, siendo los de mayor número, las co-inoculaciones con 15A y C145, que triplicaron el recuento de nódulos del control (datos no mostrados). El efecto de la inoculación del maní sobre el número de nódulos de raíz lateral presentó un comportamiento similar al de los nodulos de raíz principal, con la diferencia que la cepa Pc34 no presentó diferencias con el control, mientras que los otros dos tratamientos superaron ampliamente el número de nodulos del control (datos no mostrados).

Al considerar el número total de nódulos de los diversos tratamientos, los tres presentaron diferencias con el control (figura 30 panel B), donde la cepa nativa 15A mostró el mayor número de nódulos (> 300) comparado con el control (90). La cepa de referencia obtuvo un recuento similar al de 15A sin presentar diferencias estadísticas con el mismo. Cuando se estudió el peso seco de los nodulos de los diversos tratamientos y el control (figura 30 panel C), el único tratamiento que presentó diferencias estadísticamente significativas con el tratamiento sin inocular fue el co-inoculado con la cepa nativa 15A cuyos nódulos fueron de un tamaño mayor que los que presentaban el resto de los tratamientos.

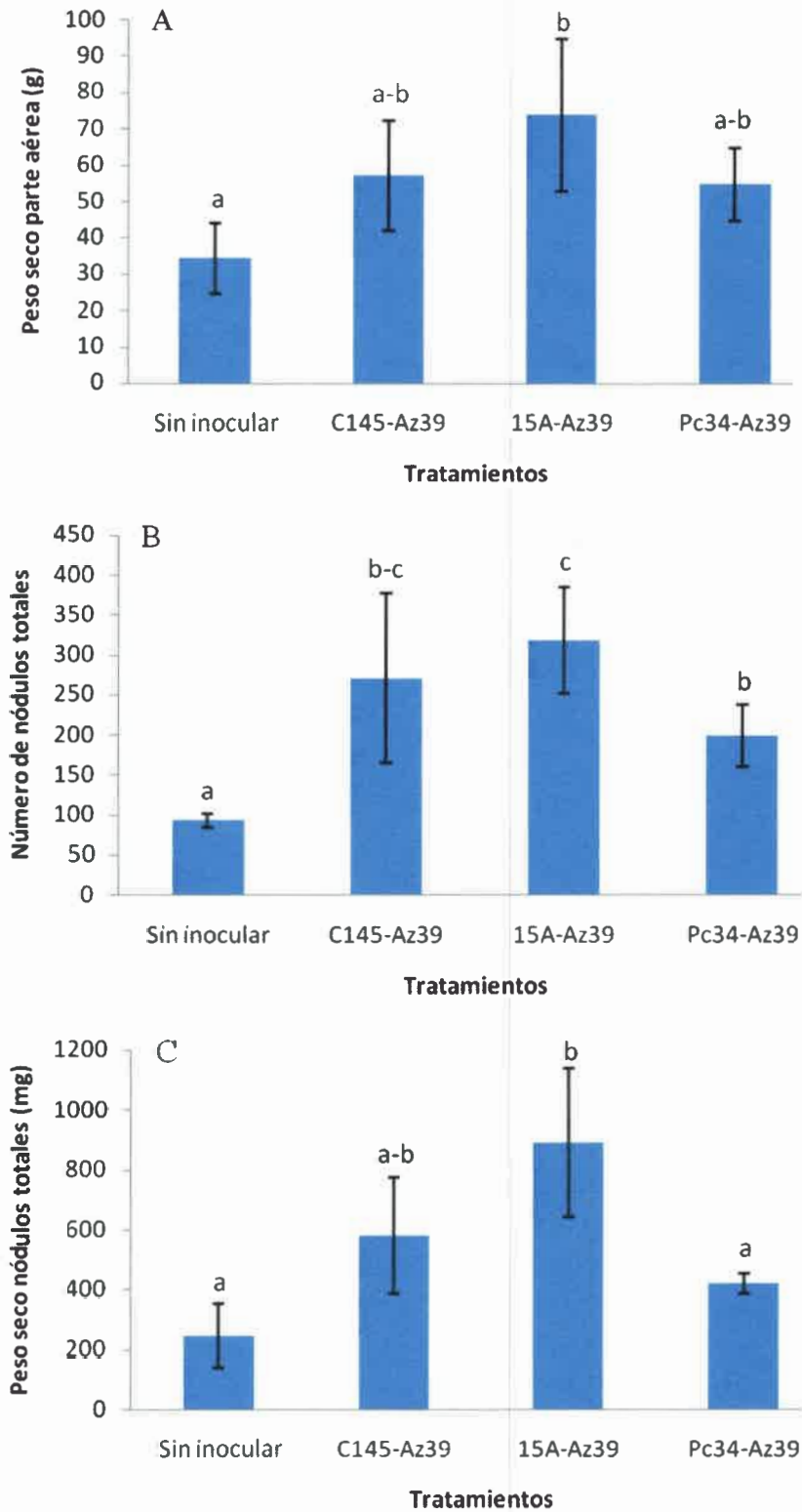


Figura 30 Efecto de la inoculación de bradyrizobios y *A. brasilense* Az39, sobre peso seco de parte aérea (A), número total de nódulos (B) y el peso seco de nódulos (C). Los datos se corresponden a la media \pm SD de 3 repeticiones independientes. ANOVA, test LSD Fisher, $p < 0,05$. Letras diferentes en las barras indican que las diferencias son estadísticamente significativas.

Al procesar el material vegetal recolectado en el campo se evidenció que el suelo utilizado para el ensayo presentó una elevada carga fúngica debido a que una alta proporción de las cajas de las plantas de maní se encontraban vacías. A pesar de la contaminación se pudo calcular las diferencias en el peso seco de las cajas entre los tratamientos, ya que cada bloque de ensayo presentó la misma carga fúngica. Los tres tratamientos presentaron una respuesta similar con valores de peso seco de las cajas que duplican al valor registrado por las plantas del control sin inocular (figura 31).

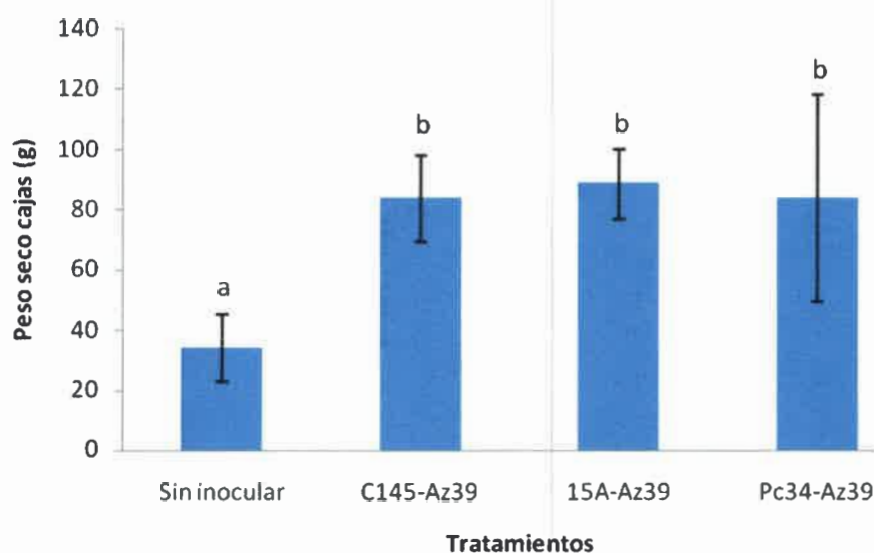


Figura 31 Efecto de la inoculación de bradyrizobios y *A. brasilense* Az39, sobre peso seco de cajas. Los datos se corresponden a la media \pm SD de 3 repeticiones independientes. ANOVA, test LSD Fisher, $p < 0,05$. Letras diferentes en las barras indican que las diferencias son estadísticamente significativas.

En resumen, se pudo observar un efecto positivo de la co-inoculación con respecto al control sin inocular en todos los parámetros medidos, nuevamente se apreció en el ensayo a campo el potencial de la cepa nativa 15A, que resulta de interés para en un futuro utilizarla en bioformulaciones para maní.

4.6.2.3.3 Análisis Multivariado de plantas a cosecha

El objeto de la realización del análisis de componentes principales para el ensayo a campo estuvo orientado principalmente a la demostración de la influencia de diferentes estrategias de co-inoculación sobre los parámetros de crecimiento y nodulación. En este sentido, se plantearon como observaciones o casos a los tratamientos de co-inoculación. Por otro lado, se consideraron las variables relacionadas a los parámetros de crecimiento (peso

seco aéreo y de cajas) y las vinculadas a parámetros de nodulación (número de nódulos y peso seco de los mismos).

La figura 32 muestra claramente la influencia de los tratamientos co-inoculados con respecto al control sin inocular en el ensayo a campo a cosecha. Los tratamientos 15A-Az39 y C145-Az39 fueron los que más influenciaron los parámetros cuantificados. En cuanto a la correlación entre variables, no se observaron correlaciones nulas o negativas, presentándose la mayor correlación entre el número de nódulos y el peso seco de parte aérea. Los parámetros de nodulación fueron positivos con respecto al peso seco de cajas aunque de menor magnitud comparado con el peso seco de parte aérea. Se produjo un distanciamiento muy marcado de los tratamientos co-inoculados respecto al control sin inocular.

El análisis realizado permite explicar el 99% de la variabilidad total del ensayo deducido de los valores estadísticos obtenidos para las componente principal 1 y 2 (PC1 y PC2).

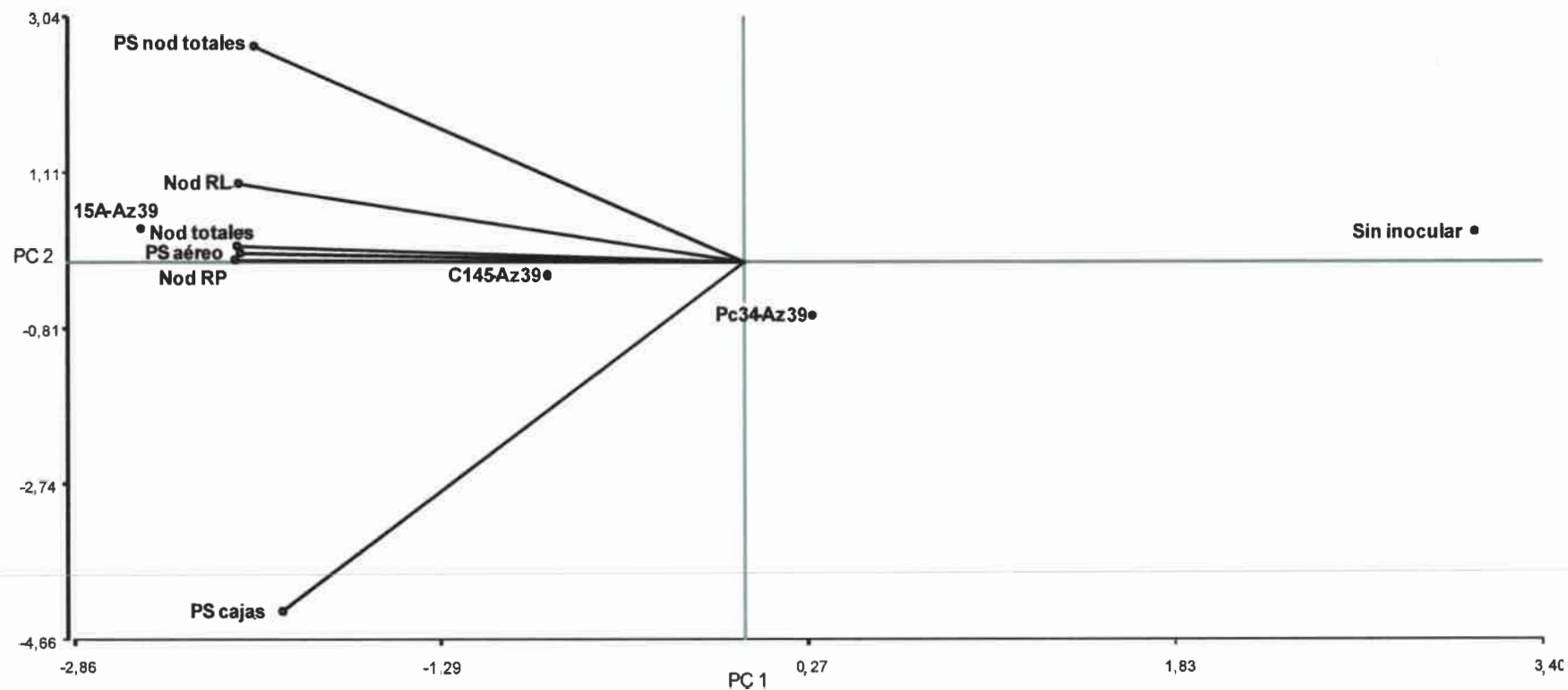


Figura 32 Gráfico bi-plot obtenido con el programa estadístico InfoStat versión 1.0. Las líneas rectas corresponden a la correlación obtenida entre las peso seco de parte aérea (PS aéreo), nódulos raíz principal (Nod RP), nódulos raíz lateral (Nod RL), peso seco de nódulos totales (PS nod totales), numero de nódulos totales (Nod totales) y peso seco de cajas (PS cajas). Los puntos aislados representan los diferentes tratamientos de inoculación aplicados. PC1: Componente principal 1, PC2: Componente principal 2.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

1. Las cepas de *Bradyrhizobium* sp. simbiotes de maní de referencia (C145, SEMIA6144 y USDA4438) como las nativas (15A y Pc34), tienen capacidad de movilidad swimming y swarming al 0,3 y 0,5% de agar respectivamente, movilidad influenciada por la variación genotípica y ambiental. El estudio de microscopia electrónica de barrido confirmó que todos los rizobios estudiados en esta Tesis Doctoral pueden diferenciar sus células vegetativas a células swarm.
2. Las diferencias encontradas en este trabajo referido a movilidad bacteriana, no tendrían relación con las velocidades de crecimiento diferenciales entre las cepas en estudio debido a que los tiempos de generación son similares (Bogino y col. 2010). Esto indicaría que la variabilidad en la movilidad entre las cepas estudiadas podría deberse a diferencias genéticas, a pesar de que todas las cepas compartan una característica en común como la capacidad de nodular las raíces de plantas de maní.
3. Las cepas de *Bradyrhizobium* sp. simbiotes de maní de referencia (C145, SEMIA6144 y USDA4438) como las nativas (15A y Pc34) responden con una quimiotaxis positiva a la presencia de exudados de semilla
4. Los fungicidas Carboxin + Tiram y Fludioxonil + Metalaxil tienen un efecto variable sobre la viabilidad, movilidad y composición de ácidos grasos de los rizobios en estudio. Carboxin + Tiram provoca la inhibición del crecimiento de todos los rizobios en estudio sin observarse efecto de Fludioxonil + Metalaxil.
5. La exposición de las cepas de *Bradyrhizobium* a los fungicidas Carboxin + Tiram y Fludioxonil + Metalaxil (dosis de campo) por 24 horas, provocó un cambio en el grado de saturación de los ácidos grasos de C145 y Pc34. Este sería un mecanismo adaptativo para mantener las propiedades biológicas de la membrana que garanticen la viabilidad y la funcionalidad celular. Las cepas SEMIA6144 y 15A frente a estos agentes químicos mostraron una mayor tolerancia.
6. En los ensayos de invernadero, los tratamientos co-inoculados entre *Bradyrhizobium* sp. y *A. brasilense* Az39 presentaron una tendencia positiva en cuanto a los parámetros de crecimiento vegetal evaluados.
7. En los ensayos a campo, el tratamiento co-inoculado presentó el mayor rendimiento comparado con las inoculaciones simples. Dentro de los tratamientos co-inoculados, las plantas tratadas con el formulado realizado con la cepa nativa 15A, obtuvo los

mejores valores de rendimientos a cosecha, estableciéndose como una cepa potencial para la utilización en el cultivo de maní.

8. La aplicación de una cepa nativa adecuada sumado a una correcta estrategia de biofertilización redonda en un incremento de la nodulación y producción de la plantas de maní.
9. En vista de la constatación de que varios efecto biológicos, ambientales y químicos afectan de manera directa o indirecta la morfología y producción del maní, se concluye que el incremento del crecimiento de *Arachis hypogaea* está influenciada por la técnica de inoculación, donde específicamente la co-inoculación resultó ser la mejor combinación tanto en invernadero como en campo. El efecto de la inoculación con diferentes cepas de bradyrizobios no fue homogéneo, esto puede deberse a la gran variabilidad que presentaron las cepas en los eventos de interacción temprana y la respuesta frente a agroquímicos. En consecuencia, en la figura 33 se esquematiza un modelo que reseña la influencia que puede acarrear la sumatoria de los diferentes factores aquí estudiados.

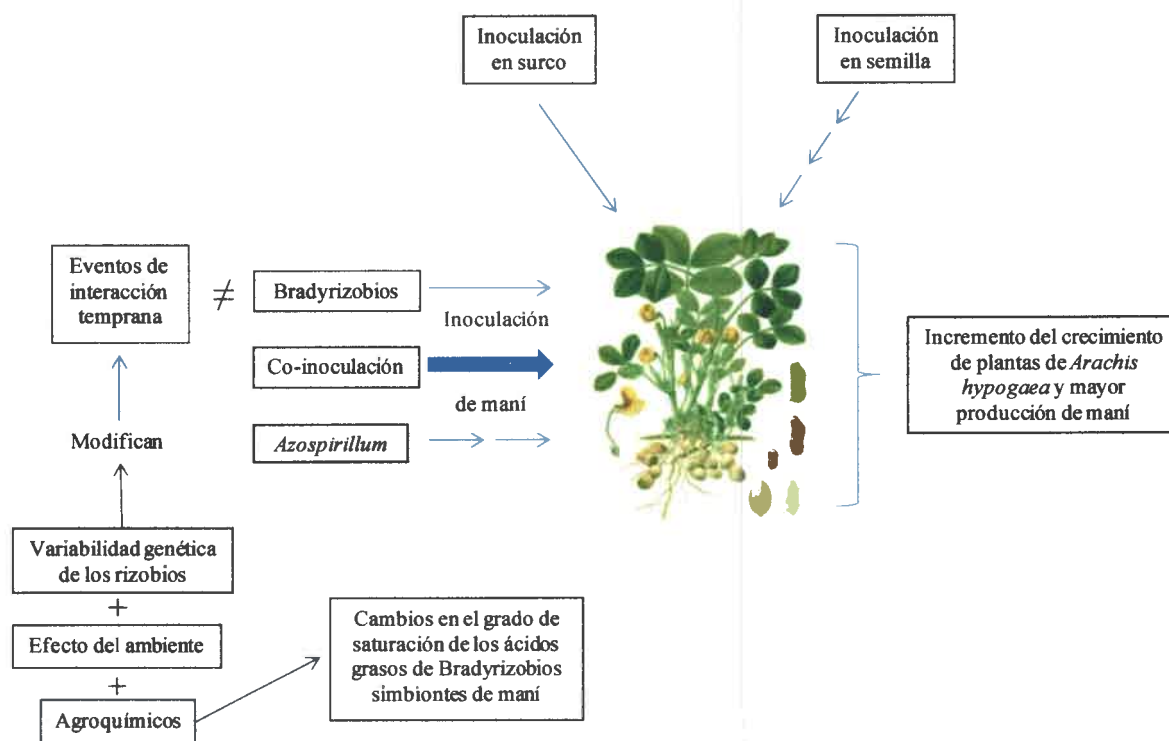


Figura 33 Modelo interactivo que refleja los efectos conjuntos derivados de la biofertilización sobre el crecimiento y producción del cultivo de maní.



CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA

- Adesemoye, A.O., Torbert, H.A., Kloepper, J.W. (2009) Plant Growth-Promoting Rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb Ecol* 58, 921-929.
- Adreani, P. (2009) La Argentina 2050. La revolución tecnológica del agro. Hacia el desarrollo integral de nuestra sociedad. En Cámara de sanidad agropecuaria y fertilizantes CASAFE. Ricci, D. (ed). Buenos Aires. p 744.
- Ahemad, M., Khan, M.S. (2011) Effect of Pesticides on Plant Growth Promoting Traits of Greengram-Symbiont, *Bradyrhizobium* sp. strain MRM6. *Bull Environ Contam Toxicol* 86, 384-388.
- Ahemad, M., Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A. (2009) Remediation of herbicides contaminated soil using microbes. En: *Microbes in sustainable agriculture*. Khan, M.S., Zaidi, A., Musarrat, J. (Eds). Nova Science Publishers Inc, New York. pp 261-284.
- Allison, C., Hughes, C. (1991) Bacterial swarming: an example of prokaryotic differentiation and multicellular behavior. *Sci Prog* 75, 403-422.
- Al Niemi, T.S., Kahn, M.L., McDermott, T.R. (1997) P metabolism in the bean *Rhizobium tropici* symbiosis. *Plant Physiol* 113, 1233-1242.
- Ames, P., Bergman, K. (1981) Competitive advantage provided by bacterial motility in the formation of nodules by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 148, 728-729.
- Antunes-Madeira, M.D.C., Videira, R.A., Lopes, V., Madeira, V.M.C. (1996) Toxicity of organophosphorus insecticides: Alteration of membrane fluidity. *Med Sci Res* 24, 753-756.
- Bal, A. (1990) Localization of plant lipids for light microscopy using p-phenylenediamine in tissues of *Arachis hypogaea* L. *Stain Technol* 65, 91-94.
- Bal, A., Hameed, S., Jayaram, S. (1989) Ultrastructural characteristics of the host-symbiont interface in nitrogen-fixing peanut nodules. *Protoplasma* 150, 19-26.
- Bal, A., Sen, D., Weaver, R. (1985) Cell wall (outer membrane) of bacteroids in nitrogen-fixing peanut nodules. *Curr Microbiol* 12, 353-356.
- Balzarini, M. (2003) Aplicaciones del análisis estadístico multivariado. Material teórico, maestría en estadística aplicada, Universidad Nacional de Córdoba.

- Beringer, J.E. (1974) R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. J Gen Microbiol 84, 188-198.
- Bhagwat, A.A., Tully, R.E., Keister, D.L. (1991) Isolation and characterization of a competition-defective *Bradyrhizobium japonicum* mutant. Appl Environ Microbiol 57, 3496-3501.
- Bohn, H.L., McNeal, B.L., O'Connor, G.A. (1993) En Química del Suelo. Grupo Noriega (Eds). Editorial Limusa, México. p 370.
- Blair, K.M., Turner, L., Winkelman, J.T., Berg, H., Kearns, D.B. (2008) A molecular clutch disables flagella in the *Bacillus subtilis* biofilm. Science 320, 1636-1638.
- Bligh, E., Dyer, W. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol 37, 911-918.
- Bogino, P. (2008) Factores que inciden sobre la competitividad y la supervivencia en el suelo de los rizobios utilizados como inoculantes de maní Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Rio Cuarto.
- Bogino, P., Banchio, E., Bonfiglio, C., Giordano, W. (2008) Competitiveness of a *Bradyrhizobium* sp. strain in soils containing indigenous rhizobia. Curr Microbiol 56, 66-72.
- Bogino, P., Banchio, E., Giordano, W. (2010) Molecular diversity of peanut-nodulating rhizobia in soils of Argentina. J Basic Microbiol 50, 274-279.
- Bogino, P., Banchio, E., Rinaudi, L., Cerioni, G., Bonfiglio, C., Giordano, W. (2006) Peanut (*Arachis hypogaea*) response to inoculation with *Bradyrhizobium* sp. in soils of Argentina. Ann Appl Biol 148, 207-212.
- Bogino, P., Nievas, F., Banchio, E., Giordano, W. (2011) Increased competitiveness and efficiency of biological nitrogen fixation in peanut via in-furrow inoculation of rhizobia. Eur J Sol Biol 47, 188-193.
- Boogerd, F.C., van Rossum, D. (1997) Nodulation of groundnut by *Bradyrhizobium*: a simple infection process by crack entry. FEMS Microbiol Rev 21, 5-27.
- Bottomley, P.J. (1992) Ecology of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium*. En: Biological nitrogen fixation. Stacey, G., Burris, R. H., y Evans, H. J. (Eds). Chapman, New York: pp 293-348.

- Boumahdi, M., Mary, P., Hornez, J. (1999) Influence of growth phases and desiccation on the degrees of unsaturation of fatty acids and the survival rates of rhizobia. *J Appl Microbiol* 87, 611-619.
- Boumahdi, M., Mary, P., Hornez, J. (2001) Changes in fatty acid composition and degree of unsaturation of (brady)rhizobia as a response to phases of growth, reduced water activities and mild desiccation. *Anton van Lee J M S* 79, 73-79.
- Brady, N.C., Weil, R.R. (1999) *The nature and properties of soils*, 12th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River NJ.
- Breaken, K., Daniels, R., Vos, K., Fauvart, M., Bachaspatimayum, D., Vanderleyden, J., Michiels, J. (2007) Genetics determinants of swarming in *Rhizobium etli*. *Microb Ecol* 55, 54-64.
- Brockwell, J., Diatloff, A., Roughley, R.J., Date, R.A. (1982) Selection of rhizobia for inoculants. En *Nitrogen fixation in legumes*. Vincent, J.M. (Ed). Academic Press, Sydney, Australia. pp 173-191.
- Brockwell, J., Pilka, A., Holliday, R.A. (1991) Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils in central New South Wales. *Aust J Exp Agric* 31, 211-219.
- Burdman, S., Vedder, D., German, M., Itzigsohn, R., Kigel, J., Jurkevitch, E., Okon, Y. (1998) Legume crop yield promotion by inoculation with *Azospirillum*. En *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century*. Elmerich, C., Kondorosi, A., Newton, W.E. (Eds). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. pp. 609-612.
- Burdman, S., Volpin, H., Kigel, J., Kapulnik, Y., Okon, Y. (1996) Promotion of nod gene inducers and nodulation in common bean (*Phaseolus vulgaris*) roots inoculated with *Azospirillum brasilense* Cd. *Applied Environ Microbiol* 62, 3030-3033.
- Butler, M.T., Wang, Q., Harshey, R.M. (2010) Cell density and motility protect swarming bacteria against antibiotics. *PNAS* 107, 3776-3781.
- Caetano-Anolles, G., Crist-Estes, D. K., Bauer, W. D. (1988) Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. *J Bacteriol* 170, 3164-3169.
- Caetano-Anollés, G., Wrobel-Boerner, E., Bauer, W.D. (1992) Growth and movement of spot inoculated *Rhizobium meliloti* on the root surface of alfalfa. *Plant physiol* 98, 1181-1189.
- CAM (2008) Cámara Argentina del maní www.Camaradelmaní.com.ar.

- Cattelan, A.J., Hartel, P.G., Fuhrmann, J.J. (1999) Screening plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci Soc Am J* 63, 1670-1680.
- Catroux, G., Hartmann, A., Revellin, C. (2001) Trends in rhizobial inoculant production and use. *Plant Soil* 230, 21-30.
- Cholaki, L., Giayetto, O., Neuman, E., Cavaignac, S. (1983) Respuesta del maní (*Arachis hypogaea* L.) a la inoculación al suelo con *Rhizobium* spp. *Revista UNRC* 3, 173-179.
- Compant, S., Christophe, C., Sessitsch, A. (2009) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem* 42, 669-678.
- Covelli, J.M., Althabegoiti, M.J., López, M.F., Lodeiro, A.F. (2012) Swarming motility in *Bradyrhizobium japonicum*. *Res Microbiol* 164, 136-144.
- Da, H.N., Deng, S.P. (2003) Survival and persistence of genetically modified *Sinorhizobium melilot* in soil. *Appl Soil Ecol* 22, 1-14.
- Daniels, R., Vanderleyden, J., Michiels, J. (2004) Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 28, 261-289.
- Dardanelli, M.S., González, P.S., Medeot, D.B., Paulucci, N.S., Bueno, M.A., García, M.B. (2009) Effects of rhizobia species on the growth and symbiotic performance of *Arachis hypogaea* under abiotic stress. *Symbiosis* 40, 175-180.
- Dardanelli, M.S., Manyani, H., Gonzales-Barroso, S. (2010) Effect of the presence of the plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) *Chryseobacterium balustinum* Aur9 and salt stress in the pattern of flavonoids exuded by soybean roots. *Plant Soil* 328, 483.
- Dardanelli, M.S., Rodríguez Navarro, D.N., Megías, M., Okon, Y. (2008) Influencia de la coinoculación *Azospirillum*-rizobios sobre el crecimiento y la fijación de N de leguminosas de interés agronómico. En: *Azospirillum* sp.: Cell Physiology, Plant Interactions and Agronomic Research in Argentina. Cassán, F., García Salamone, I. (Eds). Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina. pp. 141-151.
- Deaker R., Roughley R.J., Kennedy I.R. (2004) Legume seed inoculation technology – a review. *Soil Biol Biochem* 36, 1275-1288.
- Denton, M.D., Coventry, D.R., Howieson, J.G., Murphy, P.J., Bellotti, W.D., (2002) Competition between inoculated and naturalized *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* for nodulation of annual clovers in alkaline soils. *Aust J Agr Res* 53, 1019-1026.

- Denton, M.D., Reeve, W.G., Howieson, J.G., Coventry, D.R. (2003) Competitive abilities of common field isolates and a commercial strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* for clover nodule occupancy. *Soil Biol Biochem* 35, 1039-1048.
- Del Papa, M.F. (2001) Caracterización simbiótica y molecular de rizobios noduladores de alfalfa aislados de suelos ácidos de Argentina. Tesis Doctoral. Universidad Nacional La Plata, Argentina.
- Déziel, E., Comeau, Y., Villemur, R. (2001) Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J Bacteriol* 183, 1195-1204.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Gonzalez, L.A., Tablada, E.M., Diaz, M.P., Robledo, C.W., Balzarini, M.G. (2001) Estadística para las Ciencias Agropecuarias. Cuarta Edición. Editorial Trunfar, Córdoba, Argentina.
- Díaz-Zorita, M., Fernández, Canigia M. (2009) Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *Eur J Soil Biol* 45, 3-11.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Labandera-Gonzalez, C., Caballero-Mellado, J., Aguirre, J.F., Kapulnik, Y., Brener, S., Burdman, S., Kadouri, D., Sarig, S., Okon, Y. (2001) Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum* *Aust J Plant Physiol* 28, 871-879.
- Doyle, J., Luckow, M. (2003) The rest of the iceberg Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol* 131, 900-910.
- Dowling, D.N., Broughton, W.J. (1986) Competition for nodulation of legumes. *Ann Rev Microbiol* 40, 131-157.
- Downie, J.A., Walker, S.A. (1999) Plant responses to nodulation factors. *Curr Opin Plant Biol* 2, 483-489.
- Drouin, P., Prevost, D., Antoun, H. (2000) Physiological adaptation to low temperatures of strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* associated with *Lathyrus* spp. *FEMS Microbiol Ecol* 32, 111-120.
- Dunfield, K.E., Siciliano, S.D., Germida, J.J. (2000) The fungicides Thiram and Captan affect the phenotypic characteristics of *Rhizobium leguminosarum* strain C1 as determined by FAME and Biolog analyses. *Biol Fertil Soils* 31, 303-309.

- Eberl, L., Molin, S., Givskov, M. (1999) Surface motility of *Serratia liquefaciens* MG1. J Bacteriol 181, 1703-1712.
- Estévez Amador, J. (2007) Implicaciones básicas y aplicadas de la interacción triple rizobio-PGPR-leguminosa. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla. España.
- Fabra, A., Castro, S., Taurian, T., Angelini, J., Ibañez, F., Dardanelli, M., Tonelli, M., Bianucci, E., Valetti, L. (2010) Interaction among *Arachis hypogaea* L. (peanut) and beneficial soil microorganisms: how much is it known?. Crit Rev Microbiol 36, 179-194.
- FAO (2002) Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura. www.FAO.org
- Fouilleux, G., Revellin, C., Catroux, G. (1994) Short-term recovery of *Bradyrhizobium japonicum* during an inoculant process using mineral microgranules. Can J Microbiol 40, 322-325.
- Fox, J.E., Gullledge, J., Engelhaupt, E., Burow, M.E., McLachlan, J.A. (2007) Pesticides reduce symbiotic efficiency of nitrogen-fixing rhizobia and host plants. Proc Natl Acad Sci USA 104, 10282-10287.
- Fox, J.E., Starcevic, M., Kow, K.Y., Burow, M.E., McLachlan, J.A. (2001) Nitrogen fixation: Endocrine disrupters and flavonoid signalling. Nature 413, 128-129.
- Fraser, G.M., Hughes, C. (1999) Swarming motility. Curr Opin Microbiol 2, 630-635.
- Freter, R., O'Brien, P. C. M., Macsai, M. S. (1979) Effect of chemotaxis on the interaction of cholera vibrios with intestinal mucosa. Am J Clin Nutr 32, 128-132.
- Frink, C.R., Waggoner, P.E., Ausubel, J.H. (1999) Nitrogen fertilizer: retrospect and prospect. Proc Natl Acad Sci USA 96, 1175-1180.
- Frioni, L. (1999) Procesos microbianos. Tomo II. Editorial de la Fundación de la UNRC. Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba.
- Gannon, J.T., Manilal, V.B., Alexander, M. (1991) Relationship between cell surface properties and transport of bacteria through porous soil. Appl Environ Microbiol 57, 190-193.
- Gatani, M., Argüello, R. (2005) Sustainable construction materials with peanut husk base on Portland cement in Construction and Building Materials. Elsevier.

- Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Ceragioli, M., Beecher, D.J., Senesi, S., Wong, A.C.L. (2007) Swarming behaviour of and hemolysin BL secretion by *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 73, 4089-4093.
- Goormachtig, S., Capoen, W., Holsters, M. (2004) *Rhizobium* infection: lessons from the versatile nodulation behaviour of water tolerant-legumes. *Trends Plant Sci* 9, 518-522.
- Gordon, D.M., Ryder, M.H., Heinrich, K., Murphy, P.J. (1996) An experimental test of rhizopine concept in *Rhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol* 62, 3991-3996.
- Graham, P.H. (2000) Nodule formation in Legumes. *Enc Microb* 3, 407-417.
- Graham, P.H., Vance, C.P. (2003) Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiol* 131, 872-877.
- Gristina, A.G. (1987) Biornaterial-centered infection: Microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 237, 1588-1595.
- Gyaneshwar, P., Kumar, G.N., Parekh, L.J., Poole, P.S. (2002) Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil* 245, 83-93.
- Hardarson, G., Golbs, M., Danso, S.K.A. (1989) Nitrogen fixation in soybeans (*Glycine max* L. Merrill) as affected by nodulation patterns. *Soil Biol Biochem* 21, 783-787.
- Harshey, R.M. (1994) Bees aren't the only ones: swarming in gram negative bacteria. *Mol Microbiol* 13, 389-394.
- Harshey, M.R. (2003) Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol* 57, 249-273.
- Hartig, C., Loffhagen, N., Harms, H. (2005) Formation of trans fatty acids is not involved in growth-linked membrane adaptation of *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* 71, 1915-1922.
- Hashem, F.M., Saleh, S.A., van Berkum, P., Voll, M. (1997) Survival of *Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*) on fungicide-treated peanut seed in relationship to plant growth and yield. *World J Microb Biot* 3, 335-340.
- Henrichsen, J. (1972) Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev* 36, 478-503.
- Hernandez, B.S., Focht, D.D. (1984) Invalidity of the concept of Slow Growth and Alkali Production in cowpea rhizobia. *Appl Env Microb* 48, 206-210.
- Hirsch, A.M. (1992) Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol* 122, 211-237.

- Hirsch, A.M., Fang, Y., Asad, S., Kapulnik, Y. (1997) The role of phytohormones in plant-microbe symbiosis. *Plant Soil* 194, 171-184.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.L. (1938) The water culture method for growing plants without soil. *Calif AES Bull* 347.
- Howieson, J.G., Malden, J., Yates, R.J., O'Hara, G.W., (2000) Techniques for the selection and development of elite inoculant strains of *Rhizobium leguminosarum* in southern Australia. *Symbiosis* 28, 33-48.
- Hubac, C., Guerrier, D., Ferran, J., Trémolières, A., Kondorosi, A. (1992) Lipid and protein composition of outer and inner membranes in wild-type strains and nod mutants of *Rhizobium meliloti*. *J Gen Microbiol* 138, 1973-1983.
- Ibekwe, A.M., Papiernik, S.K., Gan, L.J., Yates, S.R., Yang, C.H., Crowley, D.E. (2001) Impact of fumigants on soil microbial communities. *Am Soc Microbiol* 67, 3245-3257.
- Jetten, M.S.M. (2008) The microbial nitrogen cycle. *Environ Microbiol* 10, 2903-2909.
- Jungk, A.O. (1998) Dynamics of nutrient movement at the soil-root interface. En: *Plant Roots: the Hidden Half*. Waisel, K. (Ed). Marcel Dekker, New York, pp 529-556.
- Kates, M. (1973) En: *Techniques of lipidology*. Work T y Work E (eds)
- Kato, K., Watanabe, K., Arima, Y. (2005) *Rhizobium* proliferation supporting substances in seed exudates of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Sci Plant Nutr* 51, 905-910.
- Kato, K., Arima, Y. (2006) Potential of seed and root exudates of the common bean *Phaseolus vulgaris* L. for immediate induction of rhizobial chemotaxis and nod genes. *Soil Sci Plant Nutr* 52, 432-437.
- Kijne JW (1992) The *Rhizobium* infection process. En *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey, G., Burris, R., Evans, H. (Eds). Chapman and Hall, New York pp 349-398
- Kockro, R.A., Hampl, J.A., Jansen, B., Peters, G., Scheihing, M., Giacomelli, R., Kunze, S., Aschoff, A., Med. J. (2000) Use of scanning electron microscopy to investigate the prophylactic efficacy of rifampin-impregnated CSF shunt catheters. *Microbiol* 49, 441-450.
- Koshland, D.E., Jr. (1980) *Bacterial chemotaxis as a model behavioral system*. Raven Press, New York.
- Kosslak, R.M., Bohlool, B.B. (1985) Influence of environmental factors on interstrain competition in *Rhizobium japonicum*. *Appl Environ Microbiol* 49, 1128-1133.

- Lakshminarayana, K., Sharma, P.K. (1994) Molecular mechanism of nodulation in *Rhizobium*-legume symbiosis. En *Biology of Nitrogen Fixing Organisms*. Prasad, A.B., Vaisapalayam, A. (Eds). Jodhpur: Scientific Publishers. pp 115-177.
- Lambrecht, M., Okon, Y., Vande Broek, A., Vanderleyden, J. (2000) Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends Microbiol* 8, 298-300.
- Lavin, M., Pennington, R., Klitgaard, B., Sprent, J., Lima, H., Gasson, P. (2001) The dalbergioid legumes. (*Fabaceae*), delimitation of a pantropical monophyletic clade. *Amer J Bot* 88, 503-533.
- Leung, K., Yap, K., Dashti, N., Bottomley, P.J. (1994) Serological and ecological characteristics of a nodule-dominant serotype from an indigenous soil population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Appl Environ Microb* 60, 408-415.
- Liu, R., Tran, V.M., Schmidt, E.L. (1989) Nodulating competitiveness of a nonmotile Tn7 mutant of *Bradyrhizobium japonicum* in nonsterile soil. *Appl Environ Microbiol* 55, 1895-1900.
- López-García, S., Vásquez, T.E.E., Favelukes, G., Lodeiro, A.R. (2002) Rhizobial position as a main determinant in the problem of competition for nodulation in soybean. *Environ Microbiol* 4, 216-224.
- Lugtenberg, B., Kamilova, F. (2009) Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63, 541-556.
- Luria, S.E., Burrous J.W. (1955) Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. *J Bacteriol* 74, 461-476.
- Lynch, J.M. (1990) Introduction: consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil. En: *The Rhizosphere*. Lynch, J.M. (ed). John Wiley and sons, Chichester pp 1-10.
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., Batut, J. (2009) Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *Rhizobium* recipes?. *Trends Microbiol* 10, 458-466.
- Matsumoto, K. (2001) Dispensable nature of phosphatidylglycerol in *Escherichia coli*: dual roles of anionic phospholipids. *Mol Microbiol* 39, 1427-1433.
- Mattick, J.S. (2002) Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* 56, 289-314.

- McDermott, T.R., Graham, P.H. (1989) *Bradyrhizobium japonicum* inoculant motility, nodule occupancy, and acetylene reduction in the soybean root system. *Appl Environ Microbiol* 55, 2493-2498.
- Macfarlane, S., Hopkins, M.J., Macfarlane, G.T. (2001) Toxin synthesis and mucin breakdown are related to swarming phenomenon in *Clostridium septicum*. *Infect Immun* 69, 1120-1126.
- McLoughlin, T.J., Dunican, L.K. (1985) Competition studies with *Rhizobium trifolii* in laboratory experiments. *Plant Soil* 88, 139-143.
- Medeot, D.B., Bueno, M.A., Dardanelli, M.S, García de Lema, M.B. (2007) Adaptational changes in lipids of *Bradyrhizobium* SEMIA 6144 nodulating peanut as a response to growth temperature and salinity. *Cur Microbiol* 54, 31-35.
- Medeot, D.B., Sohlenkamp, C., Dardanelli, M.S., Geiger, O., García, M.B., López-Lara, I.M. (2010) Phosphatidylcholine levels of peanut-nodulating *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 affect cell size and motility. *FEMS Microbiol* 303, 123-131.
- Melgar, R. (2005) El Mercado de fertilizantes en la Argentina y su relación con el sector agropecuario. En *Fertilidad de suelos y Fertilización de Cultivos*. Echeverría, H.E., García F.O. (Eds). Ediciones INTA pp 489-502.
- Menna, P.; Barcellos, F.G.; Hungria, M. (2009) Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on Multilocus Sequence Analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. *Int J Syst Evol Microbiol*. 59, 2934-2950.
- Mergaert, P., van Montagu, P., Holster, M. (1997) Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Mol Microbiol* 25, 811-817.
- Michelena, V., Mata, A., Pino, F. (1996) Memorias de la XVIII Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia.
- Moawad, H., Bohlool, B.B. (1984) Competition among *Rhizobium* spp. for nodulation of *Leucaena leucocephala* in two tropical soils. *Appl Environ Microbiol* 48, 5-9.
- Ogunseitan, O. (2005) *Microbial diversity: form and function in prokaryotes*. Blackwell Science Ltd., Massachusetts, USA, p 142.
- Okazaki, S., Yuhashi, K., Minamisawa, K. (2003) Quantitative and time-course evaluation of nodulation competitiveness of rhizobitoxine-producing *Bradyrhizobium elkanii*. *FEMS Microbiol Ecol* 45, 155-160.

- O'Toole, G.A., Kolter, R. (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28, 449-461.
- Overhage, J., Bains, M., Brazas, M.D., Hancock, R.E.W. (2008) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *J Bacteriol* 190, 2671-2679.
- Paerl, H.W., Gallucci, K.K. (1985) Role of chemotaxis in establishing a specific nitrogen fixing cyanobacterial-bacterial association. *Science* 277, 647-649.
- Paulucci, N.S., Medeot, D.B., Dardanelli, M.S., García de Lema, M.B. (2011) Growth temperature and salinity impact fatty acid composition and degree of unsaturation in peanut-nodulating rhizobia. *Lipids* 46, 435-441.
- Provorov, N.A., Vorobyov, N.I. (2000) Population genetics of rhizobia: construction and analysis of an 'infection and release' model. *J Theor Biol* 205, 105-119.
- Ribet, J., Drevon, J.J. (1996) The phosphorus requirement of N₂-fixing and urea-fed *Acacia mangium*. *New Phytol* 132, 383-390.
- Rodelas, B., Gonzalez-Lopez, J., Salmeron, V., Pozo, C., Martínez-Toledo, M.V. (1996) Enhancement of nodulation, N₂-fixation and growth of faba bean (*Vicia faba* L.) by combined inoculation with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* and *Azospirillum brasilense*. *Symbiosis* 21, 175-186.
- Rodelas, B., González-Lopez, J., Martínez-Toledo, M.V., Pozo, C., Salmerón, V. (1999) Influence of *Rhizobium/Azotobacter* and *Rhizobium/Azospirillum* combined inoculation on mineral composition of faba bean (*Vicia faba* L.). *Biol Fert Soils* 29, 165-169.
- Rodríguez, H., Fraga, R. (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv* 17, 319-339.
- Rosas, S.B., del Carmen Secco, M., Ghittoni, N.E. (1980) Effects of pesticides on the fatty acid and phospholipid composition of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 40, 231-234.
- Russell, N., Fukunaga, N. (1990) A comparison of thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 75, 171-182.
- Ruttan, V.W. (1999) The transition to agricultural sustainability. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 5960-5967.

- Sadowsky, M.J., Tully, R.E., Cregan, P.B., Keyser, H.H. (1987) Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* serogroup 123 and its relation to genotype-specific nodulation of soybean. *Appl Environ Microbiol* 53, 2624-2630.
- SAGPyA. (2004) Secretaría de agricultura, ganadería, pesca y alimentos <http://www.sagpyamecon.gov.ar>.
- SAGPyA. (2008) Secretaría de agricultura, ganadería, pesca y alimentos <http://www.sagpyamecon.gov.ar>.
- Sajbidor, J. (1997) Effect of some environmental factors on the content and composition of microbial membrane lipids. *Crit Rev Biotechnol* 17-87.
- Sanchez, A.C., Gutierrez, R.T., Santana, R.C., Urrutia, A.R., Fauvart, M., Michiels, J., Vanderleyden, J. (2014) Effects of co-inoculation of native *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains on growth parameters and yield of two contrasting L. genotypes under Cuban soil conditions. *Eur J Soil Biol* 62, 105-112.
- Sarig, S., Kapulnik, Y., Okon, Y. (1986) Effect of *Azospirillum* inoculation on nitrogen fixation and growth of several winter legumes. *Plant Soil* 90, 335-342.
- Sen, D., Weaver, R.W., Bal, A.K. (1986) Structure and organization of effective peanut and cowpea root nodules induced by rhizobial strain 32H1. *J Exp Bot* 37, 356-363.
- Sessitsch, A., Howienson, J.G., Perret, X., Antoun, H.Y., Martinez-Romero, E. (2002) Advances in *Rhizobium* research. *Plant Sci* 21, 323-378.
- Sharma, M., Anand, S.K. (2002) Swarming: A coordinated bacterial activity. *Cur Science* 83, 707-715.
- Siddique, A., Bal, A. (1991) Nitrogen fixation in peanut nodules during dark periods and detopped conditions with special reference to lipid bodies. *Plant Physiol* 95, 896-899.
- Singh, C.S., Pandey, V.C., Singh, D.P. (2011) Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *AGEE* 140, 339-353.
- Soby, S., Bergman, K. (1983) Motility and Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* in soil. *Appl Environ Microbiol* 46, 995.
- Somasegaran, P., Hoben, H.J. (1994) Handbook for rhizobia: methods in legume- *Rhizobium* technology. En: Springer-Verlag New York 166, 268-270.
- Somers, E., Vanderleyden, J., Srinivasan, M. (2004) Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet *Critical. Rev Microb* 30, 205-240.

- Sprent, J. (2001) Nodulation in Legumes, Kew, Royal Botanical Gardens, Surrey, UK p 146.
- Sprent, J., de Faria, S. (1988) Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. *Plant Soil* 110, 157-165.
- Stalker, H.T. (1997) Peanut (*A. hypogaea* L.). *Field Crop Res* 53, 205-217.
- Star, L., Matan, O., Dardanelli, M.S., Kapulnik, Y., Burdman, S., Okon, Y. (2012) Effect of *Azospirillum brasilense* strain Sp7 and mutants, on *Vicia sativa* spp nigra-*Rhizobium leguminosarum* bv viciae symbiosis. *Plant Soil* 356, 165-174.
- Stevenson, F.C., Van Kessel, C. (1996) A landscape-scale assessment of the nitrogen and non-nitrogen benefits of pea in a crop rotation. *Soil Sci Soc Am J* 60, 1797-1805.
- Streeter, J.G. (1994) Failure of inoculant rhizobia to overcome the dominance of indigenous strains for nodule formation. *Can J Microbiol* 40, 513-522.
- Sturz, A.V., Christie, B., Nowack, J. (2000) Bacterial role in developing sustainable systems of crop production. *Crit Rev Plant Sci* 19, 1-30.
- Suutari, M., Laakso, S. (1994) Microbial fatty acid and thermal adaptation. *Crit Rev Microbiol* 20, 285-328.
- Tas, E., Leinonen, P., Saano, A., Räsänen, L.A., Kaijalainen, S., Piippola, S., Hakola, S., Lindström, K. (1996) Assessment of Competitiveness of *Rhizobia* Infecting *Galega orientalis* on the Basis of Plant Yield, Nodulation, and Strain Identification by Antibiotic Resistance and PCR. *Appl Environ Microbiol* 62, 529-535.
- Tambalo, D.D., Yost, C.K., Hynes, M.F. (2010) Characterization of swarming motility in *Rhizobium leguminosarum* bv. Viciae. *FEMS Microbiol* 307, 165-174.
- Taurian, T. (2003) Caracterización de aislamientos nodulantes de maní (*Arachis hypogaea* L.) representativos de la zona manisera de Córdoba. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Taylor, T.B., Buckling, A. (2010) Competition and dispersal in *Pseudomonas aeruginosa*. *Am Nat* 176, 83-89.
- Thies, J.E., Singleton, P.W., Bohlool, B.B. (1991a) Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. *Appl Environ Microbiol* 57, 19-28.
- Thies, J.E., Singleton, P.W., Bohlool, B.B. (1991b) Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. *Appl Environ Microbiol* 57, 19-28.

- Tighe, S.W., de Lajudie, P., Dipietro, K., Lindström, K., Nick, G., Jarvis, B.D.W. (2000) Analysis of cellular fatty acids and phenotypic relationships of *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* species using the Sherlock Microbial Identification System. *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 787-801.
- Tilman, D., Fargione, J., Wolff, B., D'Antonio, C., Dobson, A., Howarth, R., Schindler, D., Schlesinger, W.H., Simberloff, D., Swackhamer, D. (2001) Long term forecasts of agriculturally driven global change. *Science* 292, 281-284.
- Toro, N. (1996) Nodulation competitiveness in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *World J Microbiol Biotechnol* 12, 157-162.
- Triplett, E.W., Barta, T.M. (1987) Trifolitoxin production and nodulation are necessary for the expression of superior nodulation competitiveness by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain T24 on clover. *Plant Physiol* 85, 335-342.
- Triplett, E.W., Sadowsky, M.J. (1992) Genetics of competition for nodulation of legumes. *Annu Rev Microbiol* 46, 399-428.
- Uberto, M.E., Cisneros, J.M., Cholaky, C., Pedelini, R. (2002) Efecto de rotaciones y labranzas sobre materia orgánica de un suelo típico del área núcleo manisera. *Revista XVII Jornada Nacional de Maní*, 19 de setiembre de 2002.
- UMSIIA (2013) Unidad Ministerial del Sistema Integrado de Información Agropecuaria. magya.cba.gov.ar/Umsiia.aspx.
- Unkovich, M.J., Pate, J.S., Sanford, P. (1997) Nitrogen fixation by annual legumes in Australian Mediterranean agriculture. *Aust J Agric Res* 48, 267-293.
- van Dillewijn, P., Soto, M.J., Villadas, P.J., Toro, N. (2001) Construction and environmental release of a *Sinorhizobium meliloti* strain genetically modified to be more competitive for alfalfa nodulation. *Appl Environ Microbiol* 67, 3860-3865.
- Veitch, N.C. (2007) Isoflavonoids of the Leguminosae. *Nat Prod Rep* 24, 417-464.
- Verstraeten, N., Braeken, K., Debkumari, B., Fauvart, M., Fransaeer, J., Vermant, J., Michiels, J. (2008) Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends Microbiol* 16, 496-506.
- Vessey, J.K. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255, 571-586.

- Videira, R.A., Peca, L.P.S., Antunes-Madeira, M.D.C., Madeira, V.M.C. (1994) Effects of malathion on membrane fluidity and its implications for the mechanisms of toxicity. *Med Sci Res* 22, 551-553.
- Vincent, J. (1970) A manual for the practical study of root nodule bacteria. En International biological programme. Handbook N° 15. Blackwel Scientific Publication, Oxford, UK.
- Vinuesa, P. (1998) Genetic and phenotypic analysis of *Rhizobium etli* and *R. tropici* mutants defective in lipopolysaccharide biosynthesis and acid-tolerance, and applications of genomic typing methods. PhD Thesis, Philipps-Universität, Marburg.
- Volfson, V., Fibach-Paldi, S., Paulucci, N.S., Dardanelli, M.S., Matan, O., Burdman, S., Okon, Y. (2013) Phenotypic variation in *Azospirillum brasilense* Sp7 does not influence plant growth promotion effects. *Soil Biol Biochem* 67, 255-262.
- von der Weid, J.M. (1994) Agroecología y agricultura sustentable. *Agroecología y Desarrollo. Revista de CLADES* 7, 9-14.
- Wadhams, G.H., Armitage, J.P. (2004) Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 1024-1037.
- Wani, P.A., Zaidi, A., Khan, A.A., Khan, M.S. (2005) Effect of phorate on phosphate solubilization and indole acetic acid releasing potentials of rhizospheric microorganisms. *Ann Pl Protec Sci* 13, 139-144.
- Walker, M.E., Minton, N.A., Dowler, C.C. (1976) Effects of herbicide, a nematicide and *Rhizobium* inoculant on yield, chemical composition and nodulation of Starr peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *Peanut Science* 3, 49-51.
- Wei, Y., Wang, X., Liu, J., Nememan, I., Singh, A., Weiss, H., Levin, B.R. (2011) The population dynamics of bacteria in physically structured habitats and the adaptive virtue of random motility. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 108, 4047-4052.
- Weaver, R.W., Frederick, L.R. (1974) Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glicine max* L. Merrill. I. Greenhouse studies. *Agron J* 66, 229-232.
- Williams, F.D., Schwarzhoff, R.H. (1978) Nature of the swarming phenomenon in *Proteus*. *Annu Rev Microbiol* 32, 101-122.
- Yaryura, P.M., León, M., Correa, O.S., Kerber, N.L., Pucheu, N.L., Garcia, A.F. (2008) Assessment of the role of chemotaxis and biofilm formation as requirements for colonization of roots and seeds of soybean plants by *Bacillus amyloliquefaciens* BNM339. *Curr Microbiol* 56, 625-632.

- Zaat, S.A.J., Wijffelman, C.A., Spaink, H.P., Van Brussel, A.A.N., Okker, R.J.H., Lugtenberg, B.J.J. (1987) Induction of the nodA promoter of *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI by plant flavonones and flavones. *J Bacteriol* 169, 198-204.
- Zahran, H.H. (1999) *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. *Microbiol Mol Biol R* 63, 968-989.
- Zhdankin, V., Sprott, J.C. (2010) Simple predator-prey swarming model. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 82, 056209.

33