

74402

VALETTI, LUCIO

Indagine periodica del circolo delle società e banche n. 1 - dicembre

2015

74402



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS NATURALES

***Bacterias promotoras del crecimiento vegetal
asociadas a Brassica napus L.: desarrollo y
evaluación de estrategias biotecnológicas para
su aplicación.***

Tesis para aspirar al título de Doctor en Ciencias Biológicas

Mic. Lucio Valetti
Directora: Adriana Fabra
Codirectora: Liliana Iriarte

- 2015 -

74402

MFN:

Clasif:

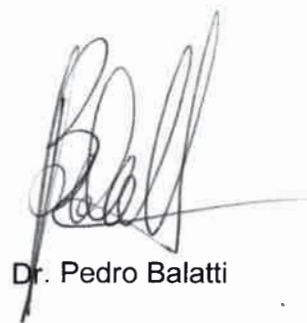
T. 983

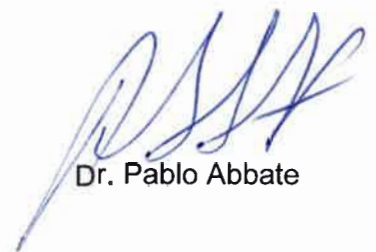


*El presente trabajo fue realizado en la Facultad de Ciencias Exactas,
Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto
bajo la dirección de la Dra. Adriana Fabra y codirección de la Ing.
Agrónoma Liliana Iriarte.*

Aprobado por el Tribunal de Tesis:


Dra. Liliana Odierno


Dr. Pedro Balatti


Dr. Pablo Abbate

Río Cuarto, 11 de Diciembre de 2015

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra Adriana Fabra, por darme un lugar en el laboratorio y dirigir mi tesis, por estimular mi sentido crítico y educarme como profesional y como docente, por su paciencia y contención todos estos años.
- A la Ing. Agrónoma Liliana Iriarte, por enseñarme tanto y hacerme descubrir un mundo nuevo, por su predisposición y esfuerzo.
- A mis compañeros del lab. 21, Tania, Jorge, Fer, Eli, Ana, Lili, Lau, Sole A y Sole F, Vani, Cintia, por tantas horas compartidas, tantos almuerzos juntos, por ayudar y enseñarme siempre, por estar cuando los necesité, por hacer que todo sea más divertido y aguantar todos mis despistes.
- A Stella Castro, por aguantarme en el laboratorio y siempre responder a mis dudas...aparte de recibirme con un mate en la mano.
- A mis hijos, Martina y Leandro, que son lo más importante de mi vida, el motor para seguir adelante y hacen que todo valga la pena, los amo con toda el alma.....
- A mamá y papá, por enseñarme a vivir y compartir todo, entenderme siempre, por apoyarme tanto en mi carrera.....por hacer que yo sea... Los amo.
- A mis hermanos Bruno, Santi y Esteban, mi sobrinito Timoté, mis tíos Mónica y Julio, mis primos Marco, Nacho y Juan miguel, Lili, Aline... por hacerme sentir tan querido y poder contar con ustedes siempre para lo que sea y hacer que la familia llene el corazón.
- A Belén, madre de mis hijos, que me apoyó gran parte de mi carrera y me incentivó a realizarla.
- A mis amigos de "la peña", por compartir más de 10 años de asados (con algunos empecé el cursillo de microbiología allá por el año...) donde todos hacemos terapia jaja siempre escuchando y aconsejando, hablando de la vida y resolviendo los problemas del mundo.... Cuando uno los necesita, están siempre... Enano, Ale B y Ale A, Vale, Emi,

Vieja, Manyin, Trapo, Alexis, Mati, Chileno, Manolo, Claudio, Maxi. Los quiero muchísimo.

- A mis amigos musicales, compañeros y amigos de banda... Que importantes que son para mí... Gringo, Santi, Marcos, Pablo, Martín, Eze.. por muchísima, pero muchísima más música....mi cable a tierra.
- A la Dra. Liliana Odierno, Dr. Pedro Balatti y Dr. Pablo Abbate por ser parte del jurado, por sus críticas constructivas y buena predisposición.
- A la UNRC por brindarme el espacio para formarme como profesional.
- A todos los que de una u otra forma estuvieron al lado mío y me apoyaron cuando lo necesite....

GRACIAS!!!.....

RESUMEN

Numerosas especies de bacterias del suelo pueden crecer alrededor, o en los tejidos de las plantas, estimulando su crecimiento mediante una gran variedad de mecanismos. Dichos microorganismos son conocidos colectivamente como plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) y su estudio es importante no sólo para el entendimiento del rol ecológico en su interacción con plantas sino también para su aplicación biotecnológica en áreas tales como la promoción del crecimiento vegetal. La colza, en este sentido, ha sido poco estudiada aun cuando es el segundo cultivo oleaginoso más importante en el mundo después de la soja. Considerando la importancia de utilizar dichos microorganismos para mejorar los rendimientos del cultivo y minimizar el uso de fertilizantes químicos, en este trabajo de tesis se planteó como objetivo general la identificación y evaluación de bacterias aisladas de la rizósfera de colza potencialmente útiles para incrementar los aportes de nitrógeno por la vía de la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) y/o la disponibilidad de fósforo asimilable, como así también analizar la influencia de los exudados radicales de dicho cultivo, sobre la supervivencia, crecimiento y formación de biofilm de PGPRs asociadas al mismo. Finalmente, determinar si la siembra de semillas de colza inoculadas con las bacterias promotoras del crecimiento vegetal afecta la nodulación y la micorrización de plantas de soja cuando ésta le sigue en la rotación. Se aislaron 40 morfotipos bacterianos los que se caracterizaron fenotípicamente y genotípicamente. Aquellos aislamientos que presentaron la capacidad de solubilizar fosfato o fijar nitrógeno fueron evaluados en ensayos en cámara de plantas encontrándose 7 aislamientos solubilizadores de fosfato y 6 fijadores de nitrógeno capaces de promover el crecimiento vegetal, los que fueron seleccionados para realizar ensayos a campo. Por otro lado, se determinó que, en presencia de exudados radicales de colza, no se afectó el crecimiento y la viabilidad de los aislamientos seleccionados. Sin embargo la formación de biofilm se vio inducida en la mayoría de ellos y solo en algunos se afectó la producción de señales de *quorum sensing*. En ensayos a campo, el cultivo de colza presentó una importante respuesta a la inoculación tanto con microorganismos solubilizadores de fosfato como con los fijadores de nitrógeno. Asimismo, se determinó que el cultivo de colza tiene efectos negativos en la micorrización de soja cuando ésta le sigue en la rotación. Este trabajo de tesis constituye un aporte al desarrollo de una estrategia biotecnológica, como es la inoculación con PGPRs, que posibilita incrementar el crecimiento y el rendimiento del cultivo de colza, minimizando el uso de fertilizantes químicos y contribuyendo así al desarrollo de una agricultura sustentable.

ABSTRAC

Numerous species of soil bacteria grow around or within the tissues of plants, stimulating their growth through a variety of mechanisms. These microorganisms are collectively known as plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs). The study of these bacteria is important not only for the understanding of their ecological role in the interaction with plants but also for their biotechnological application. Rapeseed, in this sense, has been little studied even though it is the second most important oilseed crop in the world after soybean. Considering the importance of using these microorganisms to improve crop yields and minimize the use of chemical fertilizers the aim of this study was to isolate and identify bacteria from the rhizosphere of rapeseed plants. Furthermore, their ability to fix nitrogen and solubilize phosphate as well as the capacity to promote plant growth were also determined. Additionally, the influence of rapeseed root exudates on survival, growth and biofilm formation ability of PGPRs associated with this crop was analyzed. Finally, the effect of the inoculation of rapeseed seeds with PGPRs on soybean plants growth, nodulation and arbuscular mycorrhiza root colonization when this follows in crop rotation was evaluated. We isolated 40 different bacterial morphotypes which were phenotypically and genotypically characterized. Those isolates that showed the capacity to solubilize phosphate or to fix atmospheric nitrogen were evaluated in greenhouse experiments. Seven phosphate solubilizing strains and 6 nitrogen fixers able to promote plant growth were selected for field trials. On the other hand, no changes in the bacterial growth were observed in medium supplemented with root exudates compared with control, and bacterial viability was not affected. However, under this condition biofilm formation was induced almost in all the isolates while the *quorum sensing* signals production was affected only in some of them. In field trials, rapeseed showed a significant response to inoculation with phosphate solubilizing or with nitrogen fixing microorganisms. Also, it was demonstrated that rapeseed cultivation has a negative effect on the soybean arbuscular mycorrhiza root colonization when this follows in crop rotation. In synthesis, this thesis is a contribution to the development of a biotechnological strategy such as inoculation with PGPRs, which enables to promote growth and increase rapeseed crop yield, minimizing the chemical fertilizers use and contributing to the development of sustainable agriculture.

INDICE

Capítulo 1: <i>Introducción</i>	
La planta de colza (<i>Brassica napus L.</i>)	1
Producción y usos industriales del cultivo	2
El cultivo de colza en Argentina	5
Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal	7
Bacterias fijadoras de nitrógeno	9
Bacterias solubilizadoras de fosfato	10
Hongos micorrícicos	11
Rol de los exudados radicales en la interacción planta-microorganismos	13
Rol de los biofilms bacterianos en la colonización de tejidos vegetales	14
Importancia del mecanismo de <i>quórum sensing</i> en la interacción planta-bacteria	16
Aplicación de PGPRs como biofertilizantes o bioestimulantes	17
Capítulo 2: <i>Hipótesis y objetivos</i>	
Hipótesis 1	21
Hipótesis 2	21
Hipótesis 3	21
Objetivo general	21
Objetivos específicos	22
Capítulo 3: <i>Materiales y métodos</i>	
Conservación de cepas bacterianas	23
Aislamiento de bacterias epífitas y endófitas de raíces de colza	23
Caracterización taxonómica de los aislamientos	24
Caracterización genotípica de los aislamientos	25
Eric-PCR	24
Secuenciación del gen <i>16S ARNr</i>	26
Determinación de la capacidad de solubilizar fosfatos y fijar nitrógeno	26

Determinación de la presencia de gen <i>nifH</i> o <i>nifD</i> en aislamientos fijadores de nitrógeno mediante la técnica de PCR	27
<i>nifH/nifD</i> -PCR	27
PCR anidada	28
Determinación del efecto de la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfato sobre el crecimiento vegetal	30
Determinación del efecto de la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno sobre el crecimiento vegetal	30
Ensayo 1: Sin la adición de fertilizante nitrógenado	31
Ensayo 2: Adición de fertilizante nitrógenado en una concentración reducida al 50%	31
Determinación de la capacidad de los aislamientos solubilizadores de fosfato seleccionados de colonizar raíces de colza	32
Obtención de exudados radicales estériles de colza	33
Estudio de la influencia de los exudados radicales sobre la supervivencia y crecimiento de bacterias solubilizadoras de fosfato	34
Estudio de la influencia de los exudados radicales sobre la capacidad de desarrollar biofilms de bacterias solubilizadoras de fosfato	34
Estudio de la influencia de los exudados radicales de colza sobre las señales de <i>quórum sensing</i>	35
Extracción de AHLs bacterias	35
Detección de autoinductores bacterianos	35
Bioensayo con <i>Chromobacterium violaceum</i> cv026	35
Bioensayo con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NT1-Pzlr4	36
Determinación del efecto de la inoculación de las semillas sobre su germinación	36
Preparación de los inoculantes con bacterias solubilizadoras de fosfato y fijadoras de nitrógeno para su evaluación en ensayos a campo	37
Ensayos a campo para evaluar el efecto de la inoculación de semillas de colza con bacterias solubilizadoras de fosfato y fijadoras de nitrógeno	37
Efecto de la inoculación de colza sobre el crecimiento y desarrollo de nódulos en plantas de soja, y la micorrización de sus raíces	39
Crecimiento en inoculación de plantas de soja	39
Evaluación de la micorrización de raíces de plantas de soja	40
Tinción de las raíces	40
Determinación del porcentaje de colonización	40
Diseño experimental y análisis estadístico	40

Capítulo 4: Resultados y discusión

Aislamiento de bacterias epífitas y endófitas	42
Caracterización de los aislamientos mediante pruebas bioquímicas	44
Determinación de la capacidad de los aislamientos de solubilizar fosfato y fijar nitrógeno	47
Efecto de la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfato sobre el crecimiento vegetal	51
Efecto de la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno sobre el crecimiento vegetal	55
Efecto de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno, en combinación con la aplicación de fertilizantes nitrogenados, sobre el crecimiento vegetal	57
Caracterización genotípica de los aislamientos	59
Amplificación de genes bacterianos involucrados en la fijación biológica de nitrógeno	61
Capacidad de colonizar raíces de colza de bacterias solubilizadoras de fosfato	63
Influencia de los exudados radicales sobre el crecimiento y la supervivencia de bacterias solubilizadoras de fosfato	65
Formación de biofilms y efecto de los exudados radicales sobre dicha capacidad en bacterias solubilizadoras de fosfato	69
Influencia de los exudados radicales de colza sobre las señales de <i>quórum sensing</i> de bacterias solubilizadoras de fosfato	73
Efecto de la inoculación de semillas de colza sobre la germinación y el crecimiento de la plántula	76
Evaluación a campo del efecto de la inoculación de semillas de colza con bacterias solubilizadoras de fosfato y fijadoras de nitrógeno	78
Evaluación del efecto de la inoculación de bacterias solubilizadoras de fosfato	80
Evaluación del efecto de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno	87
Efecto de la inoculación de colza sobre el crecimiento de la planta, el desarrollo de nódulos y la micorriación de soja	94
Efecto sobre el crecimiento y la nodulación en plantas de soja	94
Efecto de la inoculación de colza sobre la micorrización de raíces de plantas de soja	95

Capítulo 5: Conclusiones

99

Capítulo 6: Bibliografía

103

Índice de figuras

Figura 1. Planta de colza (<i>Brassica napus</i> L.).	1
Figura 2. Crecimiento y desarrollo de la planta de colza <i>Brassica napus</i> .	2
Figura 3. Composición de las diferentes grasas alimenticias.	4
Figura 4. Hectáreas sembradas con colza en Argentina en el período 1990-2014.	6
Figura 5. Colonización de la raíz por Micorrizas.	12
Figura 6. Ciclo de formación de biofilm.	15
Figura 7. Sistema de recolección de exudados radicales.	33
Figura 8. Proporción de morfotipos asociados a <i>Brassica napus</i> .	33
Figura 9. Porcentaje de aislamientos pertenecientes a los distintos géneros asociados a <i>Brassica napus</i> .	46
Figura 10. Porcentaje de aislamientos endófitos (A) y epífitos (B) correspondientes a los distintos géneros identificados.	47
Figura 11. Proporción de bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfato asociadas a <i>Brassica napus</i> .	49
Figura 12. Medición del halo de solubilización de fosfato.	50
Figura 13. Diversidad de bacterias asociadas a <i>Brassica napus</i> capaces de fijar nitrógeno (A) y solubilizar fosfato (B).	50
Figura 14. Efecto de la inoculación de bacterias solubilizadoras de fosfato sobre parámetros de crecimiento del sistema aéreo de <i>Brassica napus</i> .	53
Figura 15. Plantas de colza inoculadas con aislamientos solubilizadores de fosfato.	54
Figura 16. Efecto de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno sobre el peso fresco y seco aéreo y número de hojas de <i>Brassica napus</i> .	22
Figura 17. Efecto de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno sobre el peso fresco y seco aéreo, y el número de hojas de <i>Brassica napus</i> fertilizadas con el 50% de la dosis de nitrógeno.	58
Figura 18. Perfil ERIC-PCR de algunos aislamientos de la rizósfera de colza.	59

Figura 19. Amplificación del gen <i>nifH</i> utilizando los cebadores A) <i>polF/PolR</i> , B) <i>for1/rev1</i> , y C) <i>ForA/ForB/Rev</i> (PCR anidada).	62
Figura 20. Colonización radical de los aislamientos solubilizadores de fósforo en plantas de colza.	64
Figura 21a. Efecto de los exudados radicales de colza sobre el crecimiento de los microorganismos en medio TSB _r 50% y TSB _r 10%.	66
Figura 21b. Efecto de los exudados radicales de colza sobre el crecimiento de los microorganismos en medio TSB _r 50% y TSB _r 10%.	67
Figura 22. Efecto de los exudados radicales de colza sobre la formación de biofilm de los aislamientos creciendo en medio TSB _r 50%.	71
Figura 23. Efecto de los exudados radicales de colza sobre la formación de biofilm de los aislamientos creciendo en TSB _r 10%.	72
Figura 24. Detección de AHL mediante la cepa biosensora <i>C. violaceum</i> cv026.	74
Figura 25. Efecto de la presencia de exudados radicales de colza sobre la producción de AHLs.	75
Figura 26. Efecto de la inoculación de semillas con bacterias solubilizadoras de fosfato sobre la germinación.	77
Figura 27. Efecto de la inoculación de semillas sobre la longitud aérea y radical de plántulas (7 días).	78
Figura 28. Efecto de la inoculación de bacterias solubilizadoras de fosfato sobre el peso seco y fresco aéreo en plantas en el estadio de roseta.	81
Figura 29. Efecto de la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfato sobre el peso seco y fresco aéreo en el estadio de floración.	82
Figura 30. Efecto de la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfato sobre el peso seco aéreo en el estadio de madurez.	83
Figura 31. Efecto de la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfato sobre el contenido de fósforo por planta en el estadio de roseta.	84
Figura 32. Efecto de la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfato sobre el rendimiento, peso de 1.000 granos e índice de cosecha.	86

Figura 33. Efecto de la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno sobre el peso seco y fresco aéreo de plantas en el estadio de roseta.	88
Figura 34. Efecto de la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno sobre el peso seco y fresco aéreo de plantas en el estadio de floración.	89
Figura 35. Efecto de la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno sobre el peso seco aéreo de plantas en el estadio de madurez.	90
Figura 36. Efecto de la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno sobre el contenido de nitrógeno por planta en el estadio de roseta.	91
Figura 37. Efecto de la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno sobre el rendimiento, peso de 1.000 granos e índice de cosecha.	92
Figura 38. Raíces de soja teñidas con azul de tripán.	96
Figura 39. Porcentaje de colonización radical de plantas de soja por hongos micorrizico-arbusculares.	97

Índice de tablas

Tabla 1. Producción mundial de colza en millones de toneladas.	3
Tabla 2. Composición de ácidos oleicos y linoleicos del aceite de diferentes oleaginosas.	4
Tabla 3. Microorganismos y medios de cultivo.	23
Tabla 4. Procedencia, colonización vegetal y características morfológicas y tintoriales de los aislamientos obtenidos de plantas de <i>Brassica napus</i> .	43
Tabla 5. Pruebas bioquímicas para la Identificación de los aislamientos.	45
Tabla 6. Géneros correspondientes a los aislamientos de <i>Brassica napus</i> de acuerdo al análisis fenotípico.	46
Tabla 7. Capacidad de solubilizar fosfatos y de crecer en medios de cultivo libres de nitrógeno (JMV, NFB y JNF) de los aislamientos asociados a <i>Brassica napus</i> .	48
Tabla 8. Identificación taxonómica de los aislamientos en base a la secuencia de aproximadamente 1500 pb del gen 16S ARNr.	61
Tabla 9. Efecto de los exudados radicales de colza sobre la supervivencia bacteriana creciendo en medio TSB _r 50% y TSB _r 10%.	68
Tabla 10. Capacidad de formar biofilm de los aislamientos.	70
Tabla 11. Número de células viables de los inoculantes bacterianos.	79
Tabla 12. Propiedades físico-químicas del suelo en el que se realizaron los ensayos a campo.	79
Tabla 13. Temperatura y precipitaciones ocurridas durante la campaña 2013.	80
Tabla 14. Parámetros de crecimiento y nodulación en plantas de soja creciendo en suelo proveniente de parcelas con o sin antecedentes de cultivo de colza inoculada o sin inocular.	95

Abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
AHL(s)	N-acil homoserina lactona(s)
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosin trifosfato
cm	centímetro(s)
cm³	centímetro(s) cubico
col.	colaboradores
DMS	diferencia mínima significativa
D.O.	densidad óptica
EPS	exopolisacáridos
E.S.	error estandar
FBN	fijación biológica de nitrógeno
Fig.	figura
g	gramo(s)
ha	hectarea(s)
hs	horas
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
Kg	kilogramo(s)
LB	Luria-Bertoni
mg	miligramo(s)
min	minuto(s)
ml	mililitro(s)
mm	milímetro(s)
mM	milimolar
N	nitrógeno
NBRIP-BPB	National Botanical Research Institute's phosphate grown medium

NEA	Nordeste Argentino
nm	Nanómetro(s)
N^{ro}	número
P	fósforo
PBS	solución salina bufferada
PCR	polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
PGPR(s)	plant growth promoting rhizobacteria(s) (Rizobacteria(s) promotoras del crecimiento vegetal)
ppm	partes por millón
rpm	revoluciones por minuto
S	azufre
seg	segundo(s)
T°	temperatura
TSA	tripticosa soya agar
TSB	tripticosa soya líquido
UFC	unidades formadoras de colonia
µg	microgramo(s)
µl	microlitro(s)
µm	micrometros
°C	grados centígrados

CAPITULO 1

Introducción

La planta de colza (*Brassica napus* L.)

La colza es una oleaginosa perteneciente a la familia Cruciferae (Brassicaceae). Hay evidencias de su uso en la India desde varios siglos antes de Cristo, el que se extendió a China y Japón en la era cristiana. Debido a su capacidad de crecer y desarrollar a bajas temperaturas, su cultivo se extendió a Europa a mediados del siglo XV. Durante la segunda guerra mundial la colza se comenzó a cultivar en Canadá con la finalidad de obtener aceites de uso industrial, ya que su utilización para el consumo humano estaba limitada debido a la presencia de compuestos indeseables como el ácido erúxico. En la década del 60, se comenzaron a realizar trabajos de mejoramiento para otorgarle al aceite características de calidad y hacerlo apto para la alimentación. En Argentina la colza se introdujo en el año 1940, y en 1974 se iniciaron los primeros ensayos bioecológicos (Iriarte y Valetti, 2008).

La planta de colza es anual, posee una raíz principal pivotante. Su tallo es erecto y ramificado y puede alcanzar una altura superior a 1,60 m. Las hojas se disponen en forma alterna alrededor del tallo y poseen diferente morfología. Las flores son de color amarillo y el fruto característico de la familia de las crucíferas, denominado silicua, contiene entre 20 y 24 semillas dependiendo del cultivar y de las condiciones de cultivo (Iriarte y Valetti, 2008) (Fig. 1).



Figura 1. Planta de colza (*Brassica napus* L.)

Desarrollo y crecimiento

El término desarrollo se refiere al progreso del cultivo a través de los diferentes estadios durante su ciclo de vida (emergencia, producción de hojas o formación de roseta, inicio de la floración, plena floración, desarrollo de silicuas, formación de semillas, madurez). En cambio, el crecimiento implica el aumento de tamaño de los órganos y la acumulación de materia seca.

El período vegetativo del desarrollo de colza comprende las etapas de germinación, emergencia y formación del estado de roseta (Fig. 2). Es importante que este último se alcance rápidamente ya que ello contribuye a una mejor captación de luz, menor evaporación de agua, mejor control de malezas y mayor resistencia a las adversidades climáticas.

El período reproductivo implica la elongación de la rama floral, la floración, la formación de silicuas y la maduración (Iriarte y Valetti, 2008).

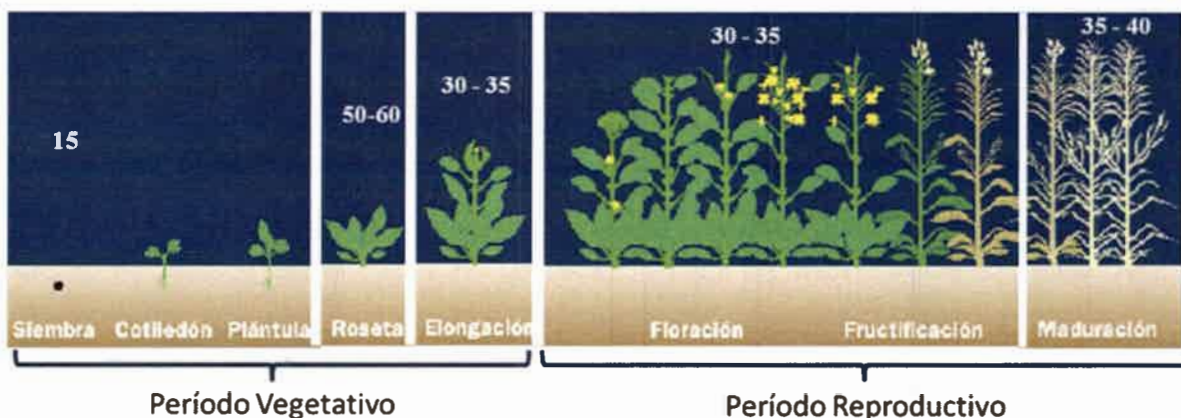


Figura 2. Crecimiento y desarrollo de la planta de colza *Brassica napus* (extraído de Iriarte y Valetti, 2008).

Producción y usos industriales del cultivo

El cultivo de colza ocupa el segundo lugar en cuanto al volumen de grano producido en el mercado mundial de semillas oleaginosas, luego de la soja. Los mayores productores mundiales son la Unión Europea, China, Canadá, India y Japón. En la actualidad, la colza es cultivada y procesada para la obtención de harinas con las que se elaboran alimentos que se emplean en la producción animal y, especialmente, aceites aptos para el consumo humano y uso industrial (Carré y Pouzet, 2014). La producción y el procesamiento del cultivo han crecido en los últimos

años, especialmente en la Unión Europea, debido principalmente al empleo del aceite para la elaboración de biocombustibles. De acuerdo a los últimos informes del Ministerio de Agricultura de Estados Unidos, en la campaña 2014/2015 se produjeron en el mundo más de 71 millones de toneladas de colza (Tabla 1).

Tabla 1. Producción mundial de colza en millones de toneladas.

<i>Países Productores</i>	<i>2008/09</i>	<i>2009/10</i>	<i>2010/11</i>	<i>2011/12</i>	<i>2012/13</i>	<i>2013/14</i>	<i>2014/15</i>
Unión Europea	18.9	21.4	20.3	19.1	19,1	21,16	24.26
China	11.0	13.2	12.8	13.0	13,5	14,4	14.6
Canadá	12.64	11.8	11.8	14.2	13,3	18	15.56
India	6.6	6.8	7.0	7.0	6,8	7,3	7.1
Otros países	9.18	6.2	6.5	7.56	9,5	10,15	10.2
Total mundial	58.32	59.40	58.4	60.83	61,1	71.01	71.72

El aceite que se obtiene de la semilla es de alta calidad ya que contiene baja proporción de ácidos grasos saturados (6%). Por otra parte, su elevado contenido de ácido oleico (alrededor del 60% y, en las variedades mejoradas, más del 80%) y bajo contenido de ácido linoleico (21%) contribuye a mejorar su calidad. En cuanto al contenido de ácido oleico, los valores son similares a los del aceite de oliva, uno de los de mayor calidad para el consumo humano. Además de los ácidos grasos esteárico, palmítico y oleico, también contiene ácidos grasos esenciales como linoleico u omega 6 y alfa linoleico u omega 3, esteroides y tocoferoles como la vitamina E (Tabla 2, Fig. 3).

Tabla 2. Composición de ácidos oleicos y linoleicos del aceite de diferentes oleaginosas.

Cultivo	% de Ácido	
	Linoleico	Oleico
Colza	21	61
Girasol	71	16
Maíz	57	29
Oliva	9	75
Soja	54	23
Maní	33	48
Algodón	54	19
Palma	10	39
Coco	2	7

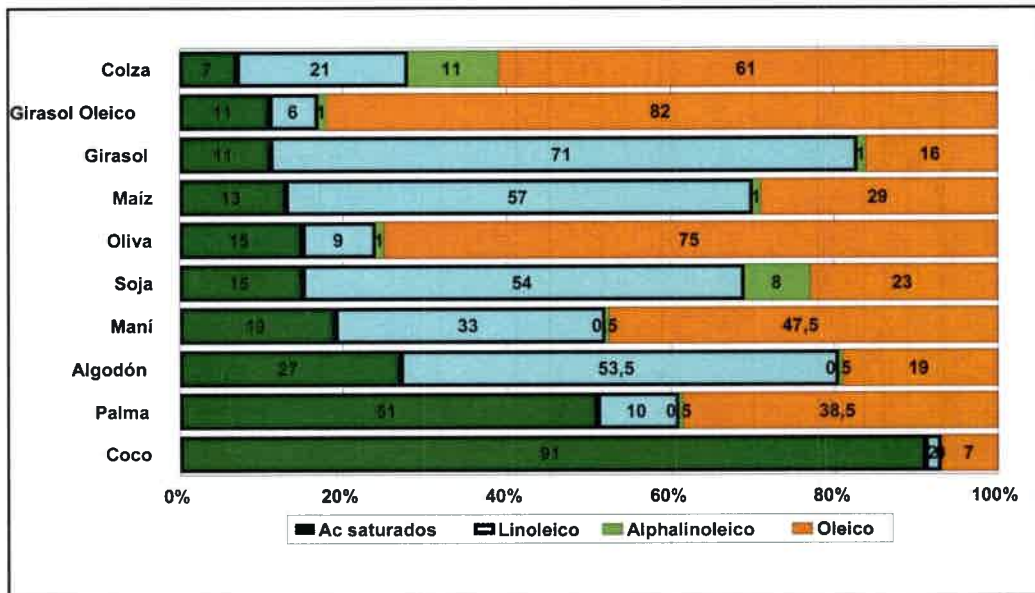


Figura 3. Composición de las diferentes grasas alimenticias. (Extraído de Iriarte y Valetti, 2008).

El cultivo de colza en Argentina

El cultivo de colza se presenta como una excelente opción en nuestro país tanto para los productores como para la industria ya que posee diversas ventajas:

a) la producción de aceite en Argentina está centrada casi exclusivamente en cultivos estivales. La colza por su ciclo invierno – primaveral accede al mercado en otra época del año, por lo cual abastece a la industria en momentos en que ésta permanece ociosa, y no se superpone con la molienda de las otras oleaginosas;

b) al tratarse de un cultivo de áreas templado-frías, brinda al productor una opción importante como componente de su rotación agrícola que en estas zonas se limita principalmente a cereales de invierno;

c) la colza, en planteos de siembra directa, permite la implementación de cultivos de segunda tales como soja o maíz; y

d) el rendimiento en aceite que se obtiene es de excelente calidad lo que permite su comercialización aún en los mercados más exigentes (Iriarte y col., 2007).

A pesar de lo mencionado anteriormente y aun cuando en la actualidad son varias las acciones que se desarrollan para impulsar la siembra de colza tanto desde el ámbito estatal (INTA, Universidades) como privado (empresas semilleras, asociaciones de productores), en nuestro país todavía no se ha logrado alcanzar un crecimiento sostenido del cultivo.

En Argentina, el área agrícola destinada a la producción de colza en 1991 y 1992 fue de 51000 ha. Sin embargo, en años posteriores, problemas en la comercialización produjeron un decrecimiento en el área sembrada. En 1996 y 1997 no se relevó superficie sembrada, y desde 1998 hasta el año 2006 ésta fue escasa, no superando las 19.000 ha. En los últimos 4 años se ha observado un incremento importante debido especialmente a la incorporación de nuevas áreas agrícolas como la del NEA, principalmente en la provincia de Entre Ríos, y algunas áreas marginales como la del norte de Córdoba y Santiago del Estero, alcanzando un máximo de 120.000 ha en el año 2012 (Fig. 4).

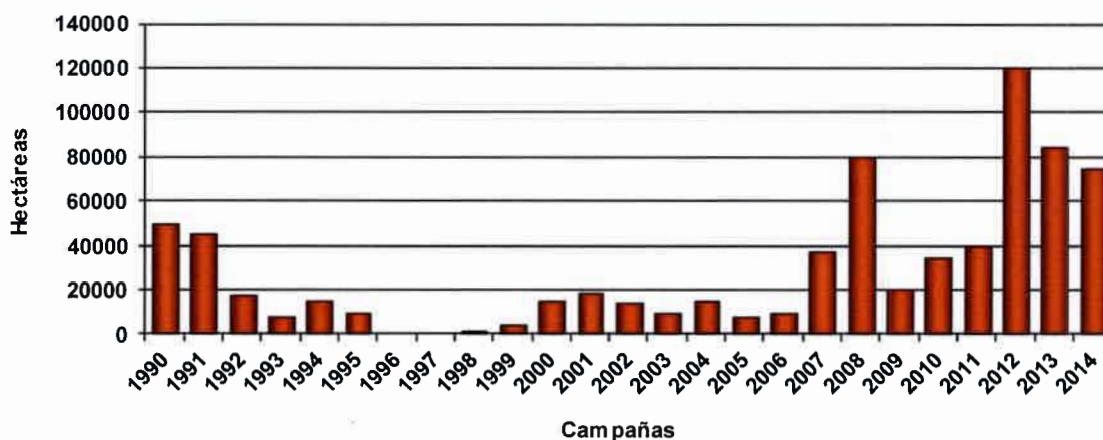


Figura 4. Hectáreas sembradas con colza en Argentina en el período 1990-2014.

Fuente: INTA. Chacra Experimental Integrada Barrow.

En nuestro país, la colza se presenta como un producto que satisface las exigencias mundiales en cuanto a calidad, se adapta a nuestras condiciones de clima y suelo, y ha demostrado tener amplio potencial de rendimiento, tanto en grano como en aceite, empleando un esquema sencillo de manejo del cultivo (Iriarte y Lopez, 2014).

Según Iriarte y Lopez (2014), para lograr un crecimiento sostenido del cultivo es necesario a) profundizar acciones referidas a investigación, desarrollo y transferencia a profesionales y productores; b) ampliar la difusión de los conocimientos relativos a implantación y cosecha; c) reforzar la genética disponible incorporando más cultivares que presenten adaptación y estabilidad ante las condiciones climáticas de una zona productiva tan amplia; d) evaluar y registrar agroquímicos para atender las necesidades sanitarias del cultivo en el país dado que prácticamente no existen en el país productos registrados para tal fin e) incrementar la eficiencia de los servicios vinculados a su producción, fundamentalmente acondicionamiento, almacenaje y transporte.

Por ello, resulta relevante implementar estrategias biotecnológicas que impulsen el desarrollo del cultivo en nuestro país, como el uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal para la elaboración de biofertilizantes, contribuyendo con ello al desarrollo de una agricultura sustentable.

Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal

Los microorganismos del suelo juegan un rol clave en la estabilidad de su estructura dado que muchos de ellos son productores de compuestos extracelulares insolubles en agua que contribuyen a la agregación de las partículas del suelo. Además, están involucrados en los ciclos biológicos de diferentes elementos químicos, en la descomposición de residuos orgánicos, pudiendo también establecer asociaciones benéficas con otros organismos. Entre las características de los microorganismos del suelo que son deseables para la producción vegetal, se pueden mencionar la capacidad de aportar nutrientes a las plantas, estimular su crecimiento y controlar o inhibir la actividad de patógenos de vegetales (Requena y col., 2001). El estudio de bacterias asociadas a plantas es importante no sólo para el entendimiento de su rol ecológico sino también para la aplicación biotecnológica de estas bacterias en áreas tales como la promoción del crecimiento vegetal (Kuklinsky-Sobral y col., 2004).

El término rizósfera puede ser definido como el volumen de suelo especialmente influenciado por las raíces de las plantas o en asociación con ellas y con el material vegetal producido (Bhattacharyya y Jha, 2012). Según Bringhurst y col. (2001), la rizósfera incluye la región del suelo unida a la raíz de la planta y se extiende unos pocos milímetros desde la superficie radical.

Las bacterias del suelo que viven alrededor, o en los tejidos de las plantas, estimulando su crecimiento por acción de diferentes mecanismos, son conocidas colectivamente como bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPRs (de **Plant Growth Promoting Rhizobacteria**) (Kloepper y col., 1989) y se seleccionan como resultado de los procesos de co-adaptación y co-evolución entre ambos organismos bajo la influencia de las raíces (Lucas García y col., 2001). Las PGPRs pueden afectar el crecimiento vegetal de un modo directo o indirecto (Glick, 1995). La promoción indirecta del crecimiento ocurre cuando las PGPRs atenúan o previenen los efectos deletéreos de uno o más organismos fitopatógenos a través de la competencia por nutrientes o hierro mediada por sideróforos, la antibiosis o la inducción de resistencia sistémica en la planta huésped (Renwick y col., 1991; Pal y col., 2001; Karthikeyan y col., 2005). La promoción directa puede estar mediada por la producción de fitohormonas (Donate-Correa col., 2004) o la provisión de ciertos nutrientes mediante diferentes procesos como la fijación de nitrógeno (Han y col., 2005) o la solubilización de fósforo (Rodríguez y Fraga, 1999). Estos microorganismos generalmente presentes en la rizósfera, muestran una quimiotaxis positiva hacia los exudados de raíces y

semillas, y utilizan compuestos químicos allí presentes como fuentes nutritivas (Zheng y Sinclair, 1996; Kumar y col., 2007; Tan y col., 2013). Los componentes químicos secretados por las raíces de las plantas juegan un papel muy importante en la selección y el enriquecimiento de un determinado tipo de bacterias en la rizósfera. Por lo tanto, la estructura de la comunidad bacteriana desarrollada en ésta, es el resultado de la presencia de ciertos tipos de constituyentes orgánicos en los exudados de la raíz, asociada a la dependencia de las bacterias para utilizarlos como fuente de energía (Narula y col. 2009).

Según el hábitat y su relación con la planta huésped, las PGPRs pueden clasificarse en dos niveles básicos de complejidad: a) epífitas y b) endófitas (Bhattacharyya y Jha, 2012). Las bacterias epífitas pueden colonizar la rizósfera (o ectorizósfera), la superficie de la raíz y a menudo los espacios intercelulares superficiales de este órgano (Bhattacharjee, 2008). Los géneros bacterianos *Agrobacterium*, *Arthobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* y *Serratia* entre otros han sido aislados de la rizósfera.

Las PGPRs endófitas colonizan los espacios apoplásticos (conocido como endorizósfera) de la planta huésped donde se han podido identificar bacterias pertenecientes a los géneros *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, y otros miembros de la familia Enterobacteriaceae (Chelius y Triplett 2000; Gyaneshwar y col., 2001; Iniguez y col., 2004; Govindarajan y col., 2007; Roesch y col., 2007; Jorquera y col 2008; Sheng y col., 2008). La relación mejor caracterizada que involucra la colonización de un huésped por un endófito es la simbiosis rizobio-leguminosa, que contribuye a la fijación biológica de nitrógeno (Vessey, 2003). La quimioatracción, adherencia e infección del microsimbionte y la formación del nódulo radical son procesos altamente complejos y regulados que actualmente están descritos con profundidad para muchas plantas leguminosas (Gualtieri y Bisseling, 2000; Spaink, 2000; Ferguson y col., 2010; Gourion y col., 2014; Downie, 2014). En cambio, para las relaciones endófitas no simbióticas, las etapas tempranas de colonización de las raíces en plantas jóvenes y el establecimiento de las comunidades en plantas maduras no son aún tan claramente entendidas (Vessey, 2003; Hardoim y col, 2008).

Bacterias fijadoras de nitrógeno

El nitrógeno (N) es un nutriente esencial para las plantas. Su habitual deficiencia en el suelo contribuye al reducido rendimiento de algunos cultivos. Si bien el nitrógeno molecular es un constituyente importante de la atmósfera (más del 70%), su utilización directa por plantas superiores o animales está restringida ya que sólo son capaces de asimilar el nitrógeno combinado, por lo que resulta necesaria una conversión previa del nitrógeno gaseoso a nitrito, nitrato o amonio (Taiz y Zieger, 1991). Esta conversión se denomina “fijación de nitrógeno” y el proceso más importante por el cual se lleva a cabo es la fijación biológica de nitrógeno.

La fijación biológica del nitrógeno atmosférico consiste en la reducción de N_2 a NH_4^+ por la enzima nitrogenasa. Es, después de la fotosíntesis, la ruta metabólica más importante para el mantenimiento de la vida en la biosfera. Curiosamente, este proceso crucial, sólo puede ser llevado a cabo por unos pocos grupos de seres vivos, todos ellos procariotas (Sprent y Sprent, 1990). Si bien los microorganismos fijadores de nitrógeno, denominados diazótrofos, no constituyen un grupo taxonómico homogéneo, comparten la característica de poseer la enzima nitrogenasa (Zehr y col., 1998). Esta enzima posee tres subunidades múltiples, las cuales están codificadas por los genes *nifH*, *nifD* y *nifK* (Rubio y Ludden, 2002). El gen *nifH* codifica la subunidad dinitrógeno reductasa y es ampliamente utilizado como marcador para el análisis de la filogenia, la diversidad y la abundancia de microorganismos fijadores de nitrógeno (Hurek y Reinhold-Hurek, 2005; Gaby y Buckley, 2012).

El grupo de bacterias diazótroficas comprende organismos fotótrofos, como los pertenecientes a las familias Rhodospirillaceae, Clorobiaceae y Cianobacteriae; organismos quimioautótrofos, como los géneros *Thiobacillus*, *Xanthobacter* y *Desulfovibrio*, y organismos heterótrofos como los pertenecientes a la familia Frankiaceae, Rhizobiaceae y a los géneros *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Clostridium* (Sprent y Sprent, 1990). Estos organismos pueden realizar la fijación biológica de nitrógeno ya sea independientemente o estableciendo relaciones simbióticas con otros organismos. La contribución global de la fijación biológica de nitrógeno es de 180×10^6 toneladas métricas de N por año. El 83% del nitrógeno fijado proviene de las asociaciones simbióticas, mientras que el resto es proporcionado por los fijadores libres (Graham, 1988).

El apoplasto en la endorizósfera parece ser un hábitat favorable para diazótrofos fijadores de nitrógeno como consecuencia de una mayor disponibilidad de carbohidratos secretados por la planta, menor competencia con otros microorganismos

y una presión de oxígeno más baja que en la ectorizósfera (Bazin y col., 1991). Varios diazótrofos han sido aislados de la endorizósfera de plantas no leguminosas, especialmente gramíneas. En plantas leguminosas, dicha asociación implica la formación en las raíces de estructuras especializadas llamadas nódulos, en donde se lleva a cabo la reducción del nitrógeno atmosférico a amonio (Sessitsch y col., 2002). Para minimizar la dependencia de fertilizantes nitrogenados en la agricultura mundial, se han propuesto diferentes alternativas que incluyen desde la modificación genética de las plantas a la optimización y mejora de la fijación biológica de nitrógeno (Vance, 2001).

Bacterias solubilizadoras de fosfatos

El fósforo (P) en las plantas se encuentra formando parte de moléculas clave como ácidos nucleicos, fosfolípidos y ATP, y cumple con funciones estructurales y regulatorias cruciales en la fotosíntesis, conversión de energía y metabolismo del carbono (Schachtman y col 1998; Raghotama, 1999; Ticconi y Abel, 2004). Después del nitrógeno, es el elemento más requerido por plantas y microorganismos. Sin embargo, a pesar de su abundancia en la naturaleza tanto en formas inorgánicas como orgánicas, es un factor limitante del desarrollo vegetal (Alexander, 1980). Las plantas deben absorberlo del suelo, donde se encuentra en muy baja concentración (entre 5 y 30 mg/Kg de suelo). Su baja disponibilidad es debida a que el fósforo soluble reacciona con iones de calcio, hierro o aluminio lo que provoca su precipitación o fijación (Rodríguez y Fraga, 1999). Los fosfatos inorgánicos aplicados como fertilizantes químicos también pueden ser inmovilizados en el suelo y como consecuencia no son aprovechados por los cultivos (Peix y col., 2001). Se calcula que el 40% de los suelos agrícolas del planeta es deficiente en fósforo disponible para las plantas (Gyaneshwar y col., 2002).

La solubilización de fósforo en la rizósfera es la actividad más comun de las PGPRs y contribuye al incremento en la captación de este nutriente por la planta hésped (Richardson, 2001). Se ha estudiado la capacidad de diferentes especies bacterianas de solubilizar compuestos de fósforo inorgánico tales como el fosfato tricálcico, fosfato dicálcico, hidroxapatita, y fosfato rocoso (Goldstein, 1986). El fósforo es también liberado de los compuestos fosforados orgánicos mediante procesos enzimáticos (Rossolini y col., 1998) mientras que la liberación de ácidos orgánicos, tales como el ácido glucónico, es el principal mecanismo por el cual los compuestos fosfatados son movilizados (Rodríguez y Fraga, 1999). Esta capacidad es una

propiedad altamente deseable en los microorganismos del suelo que podría contribuir a complementar o reemplazar a la aplicación de fertilizantes químicos. Se han realizado numerosos trabajos con diferentes microorganismos, empleando tanto inóculos simples como mixtos, los que han demostrado que su aplicación en cultivos de trigo y gramíneas produce un incremento significativo del rendimiento de las cosechas (Chabot y col., 1996; Pal, 1998; Wakelin y col., 2004; Hameeda y col., 2006; Babana y Antoun, 2006; Ahmed y El-Araby, 2012). Existen pocos antecedentes con respecto al efecto de la inoculación de bacterias solubilizadoras de fosfato en el crecimiento y el rendimiento de semillas de plantas de colza (Hall y col. 1996; Bertrand y col, 2001, Salimpour y col.2010)

Hongos micorrícicos

Además de algunas bacterias, ciertos hongos del suelo también pueden promover el crecimiento vegetal. Las micorrizas son asociaciones simbióticas mutualistas que se establecen entre las raíces de la mayoría de las plantas y las hifas de hongos pertenecientes a las familias Basidiomycota, Ascomycota y Glomeromycota. Se trata de una asociación simbiótica puesto que los hongos se benefician con el suministro de fuentes carbonadas provenientes de la planta, mientras que esta última se beneficia por la mayor cobertura de suelo a nivel de raíces facilitada por los hongos, aumentando la capacidad de absorción de nutrientes minerales, especialmente fósforo (Smith y Read, 1997). Otra ventaja de esta asociación es que la capacidad fúngica de solubilizar fósforo posibilita el uso de estos microorganismos como biofertilizantes en una gran variedad de cultivos (Neumann y George, 2004). Sin embargo, no se han identificado micorrizas en plantas de la familia Cruciferaeae (a la que pertenece colza) (Azcón y Barea, 1997).

Los hongos micorrícicos son simbioses estrictos que requieren de la colonización de la raíz de una planta susceptible de formar micorrizas para completar su ciclo de vida (Fig. 5). Dicho ciclo se inicia con la germinación de esporas. Este es un proceso independiente de la presencia de la planta hospedadora, y sólo requiere de condiciones adecuadas de humedad y temperatura (Hepper, 1981). La espora germina dando lugar al micelio que, en ausencia de la planta hospedadora, alcanza un desarrollo muy limitado. Sin embargo, en presencia de raíces micotróficas, o de los exudados radicales que producen, el desarrollo del micelio es mayor (Gianinazzi-Pearson y col., 1989; Tamasloukht y col., 2003). Una molécula señal exudada por las raíces de las plantas, denominada estrigolactona, es esencial para el establecimiento

de la simbiosis planta-micorriza (Xie y col., 2010). Además, se demostró que las estrigolactonas no solo son capaces de inducir la ramificación de las hifas, sino también de activar la función mitocondrial y la germinación de esporas (Besserer y col., 2006; Besserer y col., 2008). Cuando una hifa alcanza la superficie de la raíz, se adhiere a ella y forma una estructura llamada apresorio, a partir de la cual, se produce la penetración en la raíz de la planta dos o tres días después (Giovanetti y col., 1993; Jolicoeur y col., 1998). Las **hifas** del hongo se extienden por los espacios intercelulares de la corteza radical formando, a intervalos regulares, pequeñas ramificaciones laterales que penetran las paredes celulares y se ramifican dicotómicamente, dando lugar a los **arbúsculos**, estructura en la cual se produce el intercambio de nutrientes entre planta y hongo (Gianinazzi-Pearson y col., 1991). Por último, en ciertas especies de hongos se observa también la formación de **vesículas**, estructuras ovoides, repletas de glóbulos lipídicos cuya función es almacenar sustancias de reserva (Smith y Giannizzi-Pearson, 1988). Simultáneamente con la colonización de la raíz, el hongo desarrolla en el suelo una red de micelio que constituye la fase extra-radical de la simbiosis, principal responsable de la absorción de nutrientes minerales que serán posteriormente cedidos a la planta. Sobre las hifas extra-radicales se producen las esporas de resistencia, cerrándose de este modo el ciclo de vida (Bonfante y Perotto, 1995) (Fig. 5).

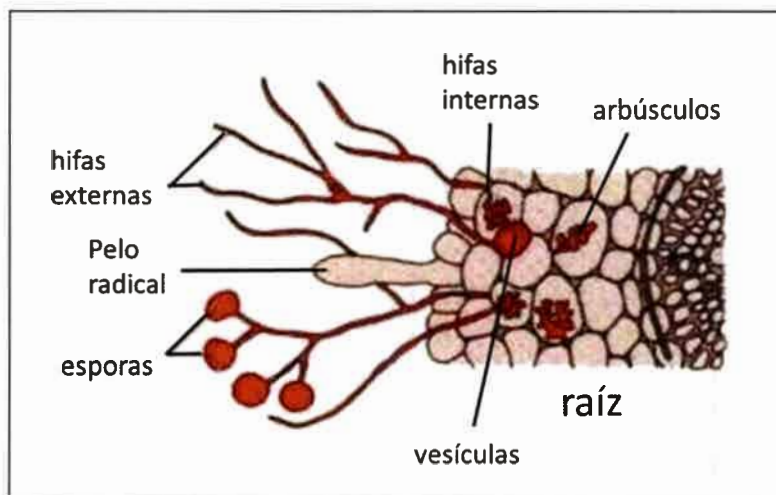


Figura 5. Colonización de la raíz por Micorrizas (Mousain, 1983).

Rol de los exudados radicales en la interacción planta-microorganismos

En las relaciones rizosféricas, las PGPRs pueden colonizar la rizósfera, la superficie radical o incluso los espacios intercelulares superficiales. Esta capacidad colonizadora de las PGPRs puede ser afectada por los cambios físicos y químicos que ocurren en el suelo, provocados por la liberación radical de diferentes compuestos de bajo peso molecular como aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, flavonoides y otros metabolitos secundarios, además de moléculas de alto peso molecular como polisacáridos y proteínas (Fageria y Stone, 2006). Dichos compuestos liberados al suelo por las raíces son conocidos como exudados radicales (Vessey, 2003; Bais y col., 2006) y constituyen la principal fuente de nutrientes para los microorganismos que habitan la rizósfera. Por lo tanto, el crecimiento bacteriano a partir de dichas moléculas es esencial para la colonización y establecimiento en la rizósfera (Haas y Defago, 2005). Es por ello que dichos exudados son considerados un factor determinante en la estructura de la comunidad bacteriana de la rizósfera (Dennis y col., 2010). La especie y edad de la planta, su estado fisiológico y grado de lignificación del aparato radical son factores que afectan la composición cualitativa y cuantitativa de los exudados radicales (Lynch, 1990; Gutiérrez Mañero y col., 1995) y, por lo tanto, influyen en el funcionamiento de la rizósfera. No obstante, la influencia directa de los exudados radicales en las comunidades microbianas de la rizósfera probablemente se limite a pequeñas ventanas espacio-temporales que rodean los ápices de las raíces (Dennis y col., 2010).

Las moléculas excretadas por las raíces de las plantas, además de constituir una fuente de sustratos carbonados y nitrogenados para los microorganismos, desempeñan varias funciones. Una de ellas es actuar como precursores para la síntesis de otras moléculas que alteran la fisiología de la planta, como por ejemplo el triptófano en la producción de auxinas. Componentes tales como carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos han demostrado estimular positivamente la quimiotaxis bacteriana (Somers y col., 2004). Los ácidos orgánicos también pueden mejorar la nutrición mineral de la planta (Dennis y col., 2010). Las micorrizas pueden reconocer la presencia de un huésped compatible a través de los exudados radicales, mediante una comunicación molecular similar al reconocimiento que ocurre entre rizobios y leguminosas (Nagahashi y Douds, 2003; Tamasloukht y col., 2003).

Se conoce que los exudados radicales contienen compuestos que pueden afectar la estructura y composición de la comunidad microbiana de la rizósfera (Hartmann y col., 2009). Algunos compuestos pueden afectar la permanencia de un microorganismo al mismo tiempo que atraen a otro, o bien dos organismos con

funciones ecológicas muy distintas pueden ser atraídos provocando, por lo tanto, consecuencias diferentes en la planta. Un ejemplo de este fenómeno es la secreción de isoflavonoides por raíces de soja que atraen simultáneamente a organismos mutualistas (*Bradyrhizobium japonicum*) y patógenos (*Phytophthora sojae*) (Morris y col., 1998). Para proliferar y establecerse en la rizósfera, las bacterias deben ser capaces de utilizar los exudados radicales, colonizar efectivamente la raíz o la superficie del suelo rizosférico y competir con otros organismos (Dennis y col., 2010).

Rol de los biofilms bacterianos en la colonización de tejidos vegetales

La colonización bacteriana de las raíces está estrechamente relacionada con la formación de biofilms (también llamados biopelículas), proceso que constituye una estrategia que les permite a las bacterias sobrevivir a la desecación y a otros estreses ambientales (Hamon y Lazazzera, 2001; Molina y col., 2003). La capacidad de formar biofilms en la semilla y en la rizósfera se ha asociado en algunos casos a una eficiente colonización de tejidos vegetales (Danhorn y Fuqua, 2007).

Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos (EPS) y adheridos a una superficie inerte o a un tejido vivo (Ramey y col., 2004). La formación de biofilms representa la forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. Estudios realizados utilizando microscopía confocal han mostrado que la arquitectura de la matriz del biofilm no es sólida y presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta sus zonas más profundas (Costerton y col., 1995; Davey y O'Toole, 2000; Stoodley y col., 2002; Simões y col., 2010) (Fig. 6).



Figura 6. Ciclo de formación de biofilms (Extraído de Studley y col., 2002).

El paso preliminar para la formación de biofilm bacteriano en la raíz, es la adherencia de la bacteria a la superficie de este órgano, en la cual participan distintas moléculas de ambos organismos como los EPS, lectinas (vegetal y bacteriana) y pili bacteriano (Leitey col., 2002; de Souza y col., 2004). En algunas especies de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Azospirillum* se han identificado diferentes factores involucrados en la formación de biofilms, tales como la movilidad flagelar (Matthysse y McMahan, 2001), proteínas de la superficie celular (Lugtenber y col., 2002) y la producción de polisacáridos (Hinsa y col., 2003). Las variaciones físico-químicas de la superficie radical, así como la disponibilidad de nutrientes, la temperatura y humedad relativa también pueden afectar la formación de los biofilm en la raíz (Stanley y Lazazzera, 2004). Además, tanto la colonización bacteriana de las raíces como la formación de biofilms están directamente relacionadas con la composición de los exudados radicales (Lugtenberg y col., 1999; Walker y col., 2004), por lo que éstos constituyen un factor importante en el desarrollo de ambos procesos (Lugtenberg y col., 1999; Walker y col., 2004; Shi y col., 2012).

Importancia del mecanismo de quórum sensing en la interacción planta-bacteria

Muchos procesos importantes en bacterias son regulados de una manera dependiente de la densidad poblacional. La regulación del comportamiento por la densidad poblacional se denomina *quórum sensing* (Fuqua y col., 1994) e involucra un mecanismo de regulación de la expresión génica dependiente de la acumulación de una molécula señal en el ambiente, denominada autoinductor, que les permite a las bacterias percibir la densidad poblacional existente y ejecutar respuestas en forma conjunta. En bacterias Gram negativas los principales autoinductores son N-acil homoserina lactonas (AHLs), mientras que en bacterias Gram positivas, en su mayoría, son péptidos (Kaiser y Losick, 1993; Donlan, 2002; Lasa y col., 2005). El *quórum sensing* bacteriano controla la expresión de genes que modulan una amplia variedad de procesos fisiológicos tales como la virulencia, la producción de EPS y de antibióticos, la resistencia al estrés oxidativo, la movilidad y la formación de biofilm, los cuales son esenciales para el éxito de una relación simbiótica o el establecimiento de un patógeno en huéspedes eucariotas (Fuqua y col. 2001; Miller y Bassler 2001; Ohtani y col., 2002; Marketon y col., 2003; Quiñones y col. 2005; Rice y col., 2005; Rinaudi y Giordano, 2010). Uno de los sistemas de *quórum sensing* más estudiados es la regulación de la bioluminiscencia en *Vibrio fischeri*. Esta es una bacteria marina Gram-negativa, luminiscente, aeróbica facultativa, que puede vivir como un simbiote específico en órganos de ciertos peces marinos y calamares, o como un organismo de vida libre en agua de mar. En vida libre la población bacteriana se encuentra en baja densidad celular. Sin embargo, en simbiosis dentro de los órganos de peces, aumenta su densidad celular y la población se torna luminiscente (Meighen, 1994). Ello es posible gracias a las proteínas, LuxI y LuxR, que controlan la expresión del operón luciferasa (*luxICDABE*) necesario para la producción de luz. LuxI sintetiza una AHL (autoinductor) que es liberada al medio, y LuxR es el receptor citoplasmático específico del autoinductor y activador transcripcional. En alta densidad celular, cuando el complejo AHL-LuxR alcanza una concentración umbral crítica, se activa la transcripción del operón que codifica para la enzima luciferasa (Stevens y col., 1994). Homólogos de *luxI* y *luxR* han sido identificados en un gran número de genomas bacterianos. Estos sistemas de detección de *quórum sensing* de tipo LuxIR controlan la expresión global de genes dependientes de la densidad celular (Case y col., 2008)

La colonización microbiana es generalmente regulada por *quórum sensing* (Whitehead y col., 2001). Está descrito que dicho proceso cumple un rol bien definido

en la formación y mantenimiento de biofilms (Allison y col., 1998; Davies y col., 1998; Li y col., 2002; Sharma y col., 2003) La rizósfera, comparada con la totalidad del suelo, contiene una alta proporción de bacterias productoras de AHLs, lo que sugiere que estas moléculas juegan un rol importante en la colonización radical (Elasri y col., 2001). Esto llevó a proponer que compuestos exudados por la raíz podrían inducir el sistema de comunicación de las bacterias e influir en su capacidad de colonizar las raíces (Bais y col., 2006; Mathesius y col., 2003; Keshavan y col., 2005). Así, por ejemplo, se ha demostrado que los exudados de raíz de poroto activan los promotores de *quórum sensing* LuxRI, AhyRI y LasR, confirmando que las raíces son capaces de secretar compuestos estructuralmente y funcionalmente similares a las AHLs de bacterias Gram negativas (Teplitski y col., 2000).

Por otra parte, se ha demostrado que algunas especies de plantas producen compuestos que afectan negativamente el proceso de *quórum sensing* bacteriano. Dicho mecanismo es denominado *quórum quenching* (Hentzer y col., 2002; Bauer y Mathesius 2004; Bais y col., 2006; Degrassi y col., 2007; Pérez-Montaño, 2013). En este sentido, se han identificado numerosos mecanismos enzimáticos y no enzimáticos de señales que interfieren en la señalización por *quórum sensing* (Zhang y Dong 2004) y que podrían inhibir procesos fisiológicos tales como la formación de biofilm (Ren y col. 2001; Perez-Montaño, 2013). Además varios autores han sugerido que la degradación enzimática de AHLs es una estrategia utilizada por varios organismos para minimizar los efectos perjudiciales causados por productos regulados por *quórum sensing* (Dong y col., 2000; Dong y col., 2002; Lee y col., 2002).

Aplicación de PGPRs como biofertilizantes o bioestimulantes

Las PGPRs pueden utilizarse como: i) agentes protectores frente a diversos fitopatógenos (Lemanceau y Alabouvette, 1993); ii) fertilizantes (Zhoinska y col., 1992; de Freitas y col., 1993; Andreeva y col., 1993; Probanza y col., 1997); iii) productores de fitohormonas que modifican la fisiología de las plantas, permitiendo optimizar los procesos de germinación de las semillas, establecimiento de la plántula y floración (Schippers y col., 1995; Probanza y col., 1996; Gutierrez Mañero y col., 1996; Asghar y col., 2002). Considerando el mecanismo de acción, Bhattacharyya y Jha (2012) clasificaron a las formulaciones desarrolladas en base a PGPRs en tres categorías generales:

- a) **Biofertilizantes:** Se aplican en la semilla, en la superficie de la planta o en el suelo. Las PGPRs colonizan la rizósfera y promueven el crecimiento de la planta a partir de un aumento en el suministro de nutrientes primarios. Los mecanismos de acción implicados son la fijación biológica de nitrógeno (Veseey, 2003) y la solubilización de fósforo, entre otros (Somers y col., 2004).
- b) **Fitoestimuladores:** Contienen microorganismos capaces de producir fitohormonas tales como el ácido indol acético, giberelinas, citoquininas y etileno (Lugtenberg y col., 2002; Somers y col., 2004).
- c) **Biopesticidas:** Controlan la viabilidad, crecimiento o actividad de agentes fitopatógenos mediante la producción de antibióticos y sideróforos (Vessey, 2003), enzimas hidrolíticas (Somers y col., 2004) y la activación de resistencia sistémica adquirida e inducida (Chandler y col, 2008).

La utilización de biofertilizantes y bioestimulantes del crecimiento y desarrollo vegetal constituye uno de los sistemas biotecnológicos con más futuro para la mejora de la producción vegetal, evitando los efectos secundarios de los métodos tradicionales de fertilización y protección frente a las plagas (Álvarez, 2009). Además, y en relación con la sustentabilidad de los sistemas agrícolas, el incremento del uso de los fertilizantes ha estado acompañado por un aumento exponencial en el consumo de formas no renovables de energía, las que se han convertido en un factor limitante para incrementar los rendimientos agrícolas. La producción industrial de fertilizantes no sería suficiente para satisfacer las necesidades de una población mundial en creciente aumento, especialmente cuando su aplicación en exceso conduce a contaminar el agua subterránea, a la eutrofización de los lagos, sumado a las emisiones de óxido nitroso que contribuyen al efecto invernadero de la atmósfera terrestre (Álvarez, 2009). Así las PGPRs cumplen un papel vital en la agricultura debido a que, por sus propiedades, contribuyen a la reducción del consumo de los fertilizantes sintéticos, y con ello, el costo de producción de los cultivos (Tahir y Sarwar, 2013).

Las PGPRs colonizan los suelos, pero generalmente se encuentran en concentraciones insuficientes (entre 10^3 - 10^4 células por gramo de suelo) para provocar el efecto benéfico deseado sobre las plantas. De aquí la importancia de potenciar su efecto aumentando el número del microorganismo de interés (para que alcance una concentración de entre 10^6 - 10^8 células por gramo de suelo) mediante la elaboración y aplicación de formulaciones que los contengan (Alvares, 2009).

Las bacterias diazótroficas utilizadas como inoculantes para plantas no leguminosas constituyen una eficiente fuente de nitrógeno. Existen antecedentes de su

aplicación en distintos cultivos con diversos resultados (Yanni y col., 1997; Baldani y col., 2000; Govindarajan y col., 2007; Bhattacharjje y col., 2008; Singh y col., 2005; Navala y col., 2004; Grupta y Grupta, 2006; Sharma y col., 1997; Rai y Caur, 1988; Ardakani y col., 2010). En Europa y África están disponibles inoculantes a partir *Azospirillum*, *Gluconobacter* y *Acetobacter* para una variedad de cultivos en los que se han reportado aumentos en los rendimientos que van del 5% al 30% (Vessey, 2003; Karthikeyan y col., 2007; Bhattacharyya y Jha, 2012). En arroz y maíz, la fijación de nitrógeno no simbiótica aporta un 20-25% del total de nitrógeno requerido, y en trigo, la inoculación con *A. brasilense* aumentó significativamente los rendimientos de follaje y de granos, y la ramificación de los pelos radicales (Okon y Labandera-González, 1994; Saikia y Jain, 2007; Mano y Morisaki, 2008; Vale Barreto Figueiredo y col., 2010; Montañez y col., 2012). Sin embargo, el impacto de la fijación de nitrógeno no simbiótica sobre la promoción del crecimiento vegetal suele ser más marcado en suelos con baja fertilidad (Santi y col., 2013). Aún cuando el cultivo de colza requiere un suministro relativamente elevado de fertilizantes nitrogenados (El-Habbasha y Abd El-Salam, 2010), se han realizado pocos estudios sobre el impacto del uso de bacterias fijadoras de nitrógeno para mejorar el crecimiento y rendimiento de dicho cultivo (Yasari y Patwardhan, 2007; Megawer y Mahfouz, 2010; El-Howeity y Asfour, 2012). Por otro lado, ha sido descrito que una pequeña proporción del total de diazotrofos identificados *in vitro* fijan nitrógeno activamente en asociación con la planta huésped (Bhattacharjje y col., 2008).

En cuanto a la solubilización de fósforo, no está aún muy clara la correlación entre la cantidad de fósforo soluble liberada por los microorganismos y la que realmente es utilizada por la planta (Adesemoye y Kloepper, 2009). Muchos estudios realizados con el fin de conocer la capacidad de algunos microorganismos de solubilizar fósforo, han sido desarrollados en medios de cultivo líquidos o sólidos bajo condiciones ambientales controladas (Peix y col., 2001; Idriss y col., 2002; Ivanova y col., 2006; Taurian y col., 2010; Anzuay y col., 2015). Para el cultivo de colza existen escasos antecedentes referidos a los beneficios de la inoculación de bacterias solubilizadoras de fosfato (Kloepper y col., 1988; Lifshitz y col., 1987; Hall y col., 1996; de Freitas y col., 1997; Bertrand y col., 2001; Salimpour y col., 2010).

Con respecto a la producción y utilización de inoculantes mixtos compuestos por bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfato, distintos trabajos confirmaron que esta estrategia produce resultados más consistentes que la inoculación con las cepas individuales (Pal, 1998; Babana y Atoun, 2006; Adesemoye y col., 2008).

Teniendo en cuenta el enorme potencial que tiene el uso de PGPRs como biofertilizantes o bioestimulantes, así como las limitaciones tecnológicas que se presentan en el cultivo de colza, es evidente la necesidad de profundizar el estudio y desarrollo de su aplicación en este cultivo, generando información que ayude al desarrollo sostenido del cultivo en nuestro país, en el marco de una agricultura sustentable.

CAPITULO 2

Hipotesis y objetivos

Hipótesis 1

La inoculación con bacterias nativas aisladas de la rizósfera de colza que colonicen sus raíces y promuevan el crecimiento vegetal incrementa el crecimiento de plantas de colza

Hipótesis 2

La composición de los exudados radicales de plantas de colza afecta la supervivencia, el crecimiento, la producción de señales de *quorum sensing* y la formación de biofilms de las bacterias inoculadas.

Hipótesis 3

La siembra de semillas de colza inoculadas con las bacterias promotoras del crecimiento vegetal no afecta la nodulación y la micorrización de plantas de soja del cultivo siguiente

OBJETIVO GENERAL

Considerando la importancia de utilizar en la inoculación, microorganismos nativos adaptados a las condiciones edafocológicas de la región, el **objetivo general** de este plan de tesis es la identificación de bacterias aisladas de la rizósfera de canola potencialmente útiles para incrementar a) los aportes de nitrógeno por la vía de la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) y/o b) la disponibilidad de fósforo asimilable en cultivo de colza.

Objetivos específicos

- 1) Aislar bacterias de la rizósfera de plantas de colza y seleccionar una cepa o una combinación de cepas con actividades que incluyan fijación de nitrógeno y solubilización de fosfatos, y que demuestren promover el crecimiento vegetal.

- 2) Estudiar la capacidad de colonización radical de dicho/s microorganismo/s

- 3) Analizar la influencia de los exudados radicales sobre la supervivencia, crecimiento, producción de señales de “quorum sensing” y la formación de biofilms de la/s bacteria/s seleccionada/s.

- 4) Estudiar el efecto de la introducción del inoculante mixto (o puro) seleccionado sobre el tiempo de germinación de la semilla y, en ensayos a campo, sobre el crecimiento de la planta.

- 5) Conocer si la introducción de colza y el inoculante mixto (o puro) en suelos agrícolas afecta el desarrollo de nódulos inducidos por simbiontes de soja (*Bradyrhizobium japonicum*), y la micorrización de sus raíces.

CAPITULO 3

Materiales y métodos

Conservación de cepas bacterianas

En la tabla 3 se describen las cepas utilizadas en este trabajo y los medios en que fueron cultivadas.

Tabla 3. Microorganismos y medios de cultivo.

Cepa	Medios de cultivos
<i>Serratia</i> sp.S119 (Taurian y col., 2010)	TSA (Britania)
<i>Pantoea</i> sp. J49 (Taurian y col., 2010)	TSA (Britania)
<i>Klebsiella</i> sp. NTI-31 (Ibáñez y col., 2009)	TSA (Britania)
<i>Azospirillum brasilense</i> Cd (EMBRAPA, Brasil)	TSA (Britania)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Rizofost®)	TSA (Britania)
<i>Sinorhizobium fredii</i> HH103 (Departamento de Ciencias del Suelo, Universidad de Minnesota.)	YEMA (Vincent, 1970)
<i>Pseudomonas aureoginosa</i> PAO1 (Holloway, 1955)	TSA (Britania)
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026 (Winson, 1995)	Luria-Bertani (LB) (Miller, 1992) Km 50 µg/ml.
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NT1-pZLR4 (Cha y col., 1998)	LB (Miller, 1992) Gm 30 µg/ml.
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> E109 (INTA Castelar, Argentina)	YEMA (Vincent, 1970)
<i>Escherichia coli</i> DH5α (Life Technologies)	LB (Miller, 1992) Amp 100 µg/ml

Con respecto a los aislamientos obtenidos de plantas de colza, éstos se repicaron en medio Tripticasa Soya Agar (TSA) (Britania) y se mantuvieron a 4°C. Para la conservación a -20°C, los cultivos bacterianos obtenidos en Tripticasa Soya Líquido (TSB) se suplementaron con Glicerol al 20%.

Aislamiento de bacterias epífitas y endófitas de raíces de colza

Las plantas de colza fueron extraídas de lotes de producción comercial ubicados en la localidad de Río Cuarto (Córdoba) y en la localidad de Tres Arroyos (Bs. As.). Los mismos se encontraban sembrados con una variedad de colza de tipo

primaveral y una variedad de tipo invernal, respectivamente. En cada uno de los sitios se recolectaron 20 plantas cuyo estado de desarrollo se correspondía con el de roseta, e inmediatamente fueron trasladadas al laboratorio y mantenidas a 4°C hasta su uso.

Para el aislamiento de bacterias epífitas se separaron las raíces, se lavaron con agua corriente, luego fueron sumergidas en solución salina bufferada (PBS), y agitadas a 180 rpm, 28 °C durante 1 h. Diluciones de esta solución se sembraron en placas conteniendo medio TSA al 10% suplementado con cicloheximida (50 µg/ml) para inhibir el desarrollo de hongos.

Para aislar los microorganismos endófitos se separaron las raíces y se esterilizaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 3% por 3 min para remover los microorganismos de la ectorizósfera. Luego, las raíces se cortaron y homogeneizaron en un mortero usando 1 ml de agua destilada estéril por cada gramo de tejido fresco. Diluciones de esta solución fueron sembradas en las mismas condiciones descriptas anteriormente.

Caracterización taxonómica de los aislamientos

Se evaluó la morfología de las colonias bacterianas obtenidas y se realizó la tinción de Gram analizándose mediante microscopía óptica la forma, tamaño y disposición celular. Se seleccionaron aquellos aislamientos que presentaron diferencias en cuanto a las características morfológicas de sus colonias y células, y a sus propiedades tintoriales. La identificación de los aislamientos se realizó a partir de las siguientes pruebas bioquímicas convencionales según el manual Bergey (Holt, y col., 1994): actividad catalasa, producción de oxidasa, fermentación de glucosa y lactosa, producción de indol, movilidad, producción de H₂S, rojo metilo, Voges Proskauer, producción de ureasa, resistencia a la bacitracina, sensibilidad a la novobiocina y prueba de la coagulasa.

Caracterización genotípica de los aislamientos*Eric-PCR*

Se siguió el método descrito por de Bruijn (1992) utilizando los cebadores E1 (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') y E2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'). El volumen de reacción fue de 12 μ l y la mezcla de reacción para cada muestra contenía:

Agua bidestilada	3,83 μ l
Buffer 10X	1,2 μ l
MgCl ₂ (25mM)	1,44 μ l
dNTPs (25mM)	1,2 μ l
E1/E2 (0, 31 μ M)	1 μ l
Taq polimerasa (5U/ μ l)	0,132 μ l
Templado de ADN	2,7 μ l
Volumen final	12 μ l

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Eppendorf Mastercycler gradient con el siguiente ciclo de temperaturas:

ETAPA	TIEMPO	CICLOS
95°C	1 min.	1
94°C	1 min.	
52°C	1 min.	35
65°C	8 min.	
68°C	16 min.	1

La separación de los fragmentos generados se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 2,5% conteniendo TBE 1X (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2.5 mM, pH 8,2), empleando como buffer de siembra blue/orange 6X (Promega). Las corridas electroforéticas se realizaron a 80 V. Para la visualización de las bandas de ADN se tiñó el gel con Syber Green.

Secuenciación del gen 16S ARNr

Los cultivos bacterianos conservados en glicerol, seleccionados para su secuenciación, fueron enviados a Macrogen Inc. Laboratories (Corea). La amplificación y secuenciación de 1500 pb del gen 16S ARNr se realizó a partir de una extracción directa de ADN empleando los primers 518F (5'-CCAGCAGCGGTAATACG-3') y 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'). El análisis de las secuencias obtenidas fue realizado utilizando el algoritmo BLASTN (Altschul y col., 1997).

Determinación de la capacidad de solubilizar fosfatos y fijar nitrógeno

La capacidad de las bacterias de solubilizar fosfato fue evaluada en placas conteniendo el medio NBRIP-BNB (Nauyital, 1999). Luego de incubarlas a 28°C durante 7 días, los cultivos de bacterias capaces de solubilizar fosfato presentaron un halo transparente alrededor de las colonias. Para cuantificar dicha capacidad, a partir de un cultivo puro en medio TSA, se resuspendió una ansada en 100 µl de H₂O estéril y se sembró por triplicado 10 µl de dicha suspensión en placas conteniendo el medio NBRIP-BNB. El halo de solubilización se midió luego de 7 días de incubación a 28°C.

La capacidad de fijar nitrógeno fue evaluada en tubos de vidrio conteniendo el medio semisólido libre de nitrógeno JNFb, NFb, o JMV, (utilizados para el aislamiento de *Azospirillum*, *Herbaspirillum* y *Burkholderia*, respectivamente). Dicha capacidad es evidenciada por la formación de un halo translúcido debajo de la superficie (Döbereiner y col., 1995).



Determinación de la presencia del gen *nifH* o *nifD* en aislamientos fijadores de nitrógeno mediante la técnica de PCR

Obtención de templados de ADN

Para la obtención de templados de ADN de bacterias Gram negativas se siguió el método descrito por Walsh y col. (1991). Una colonia bacteriana en medio TSA fue resuspendida en 300 µl de NaCl 1 M, se agitó durante 1-2 min y se centrifugó a 14.000 rpm 4 min. El sobrenadante se descartó y se agregaron 300 µl de agua bidestilada estéril, se agitó y centrifugó en las mismas condiciones descriptas anteriormente. Luego se resuspendió en 200 µl de resina (Chelex 100®) al 6%, y se calentó 20 min a 56°C y 8 min a 99°C. El templado obtenido fue conservado a -20 °C hasta el momento de utilizarlo. Para la obtención de ADN de aislamientos Gram positivos se realizó una extracción utilizando illustra™ bacteria genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare).

nifH/nifD-PCR

Para amplificar fragmentos del gen *nifH* fueron utilizados los cebadores PolF (5-TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3) y PolR (5-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3) (Poly y col., 2001); For1, (5-CACCCGCCTGATCCTGAACTCGAAGGCGC-3) y Rev1 (5-GGCCGCGTACATCGCCATCATCTCGCCGG-3) (Ruiz-Herrera y col., 2015); NifHF (5-TCTACGGAAAGGGCGGTATCGG-3) y NifHR (5- GGCACGAAGTGGATCAGCTG-3) (Flores-Mireles y col., 2007). Para amplificar fragmentos del gen *nifD* se utilizaron los cebadores *nifD*-2f (5-CATCGGIGACTACAAAYATYGGYGG-3) y *nifD*-1r (5-CCCAIGARTGCATYTGICGGAA-3) (Federov y col., 2008). El volumen de reacción fue de 25 µl y la mezcla de reacción utilizada fue la siguiente:

	PolF/PolR	For1/Rev1	NifHF/NifHR	<i>nifD</i> -2f/ <i>nifD</i> -1r
Agua bidestilada	14,4 µl	15,13 µl	15,13 µl	11,57 µl
Buffer (10Mm)	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
MgCl ₂ (50mM)	1,44 µl	0,75 µl	0,75 µl	12,5 µl
dNTPs (25mM)	1,2 µl	1,87 µl	1,87 µl	2,5 µl
Cebadores (0, 5µM)	1 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
Taq polimerasa (2U/ µl)	0,1 µl	0,25 µl	0,25 µl	0,18 µl
Templado de ADN	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Eppendorf Mastercycler gradient con los siguientes ciclo de temperaturas:

PoIF/PoIR			For1/Rev1			NifHF/NifHR			nifD-2f/ nifD-1r		
ETAPA	TIEMPO	CICLOS	ETAPA	TIEMPO	CICLOS	ETAPA	TIEMPO	CICLOS	ETAPA	TIEMPO	CICLOS
94°C	3 min.	1	94 °C	2 min.	1	94 °C	2 min.	1	96 °C	3 min.	1
94°C	2 min.		94 °C	45 seg.		94 °C	45 seg.		94 °C	1 min.	
55°C	1 min.	30	57,8 °C	45 seg.	35	57,8 °C	45 seg.	35	55 °C	1 min.	35
72°C	2 min.		72 °C	1 min.		72 °C	1 min.		72 °C	1 min.	
72°C	5 min.	1	72 °C	5 min.	1	72 °C	5 min.	1	72 °C	5 min.	1

La separación de los fragmentos generados se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% conteniendo TBE 1X (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,2), empleando como buffer de siembra colorante de PCR (Genbiotech) o blue/orange 6X (Promega). Las corridas electroforéticas se realizaron a 80 V. Para la visualización de las bandas de ADN se tiñó el gel con Syber Green.

PCR anidada

La PCR anidada se realizó según Widmer y col., (1999). Los cebadores utilizados para la primera reacción fueron *nifH(forA)* (GCIWTITAYGGNAARGGNGG) y *nifH(rev)* (GCRTAIABNGCCATCATYTC). El producto obtenido fue utilizado como molde para la segunda reacción llevada a cabo con el mismo cebador de la primera reacción *nifH(rev)* y *nifH(forB)* (GGITGTGAYCCNAAVGCNGA). La mezcla de reacción utilizada fue la siguiente:

	1ra Reacción	2ra Reacción
Agua bidestilada	14,4 µl	15,13 µl
Buffer (10Mm)	2,5 µl	2,5 µl
MgCl ₂ (50mM)	1,44 µl	0,75 µl
dNTPs (25mM)	1,2 µl	1,87 µl
cebadores (0, 5µM)	1 µl	2,5 µl
Taq polimerasa (2U/ µl)	0,1 µl	0,25 µl
Templado de ADN	2 µl	2 µl
Volumen final	20 µl	50 µl

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Eppendorf Mastercycler gradient con los siguientes ciclo de temperaturas:

1ra Reacción			2da Reacción		
ETAPA	TIEMPO	CICLOS	ETAPA	TIEMPO	CICLOS
95°C	5 min.	1	94 °C	5 min.	1
94°C	11 seg.	40	94 °C	11 seg.	40
92°C	15 seg.		92 °C	15 seg.	
54°C	8 seg.		51 °C	8 seg.	
56 °C	30 seg.		53 °C	30 seg.	
74 °C	10 seg.		74 °C	10 seg.	
72 °C	10 seg.		72 °C	10 seg.	
72°C	10 min.	1	72 °C	5 min.	1

La separación de los fragmentos generados se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% conteniendo TBE 1X (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,2), empleando como buffer de siembra colorante de PCR (Genbiotech) o blue/orange 6X (Promega). Las corridas electroforéticas se realizaron a 80 V. Para la visualización de las bandas de ADN se tiñó el gel con Syber Green.

Determinación del efecto de la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfato sobre el crecimiento vegetal

Las semillas utilizadas para los ensayos realizados en cámara de cultivo de plantas correspondieron a la variedad primaveral comercial BIOLZA 440. Éstas fueron esterilizadas en hipoclorito de sodio al 20% por 5 min. y lavadas 5 veces con H₂O destilada estéril. Se sembraron en macetas de 360 cm³ conteniendo arena volcánica previamente esterilizada, suplementada con 40 ml de CO₃(PO₄)₂ al 0,2%, y se regaron con solución de Hoagland (Hoagland, 1950) libre de fósforo cada 3 días durante todo el ensayo.

Las macetas se mantuvieron en cámara de cultivo de plantas con condiciones controladas (25°C, con un fotoperiodo de 18 hs luz, 6 hs oscuridad). La inoculación se llevó a cabo una semana después de la siembra. Para ello los cultivos bacterianos crecidos en medio TSB (D.O.₆₂₀=1; 1x10⁹ UFC/ml) fueron centrifugados, lavados y resuspendidos en igual volumen de solución fisiológica. Cada planta fue inoculada con 1 ml de esta suspensión. Como control positivo se inoculó la cepa comercial *Pseudomonas fluorescens* (aislada del inoculante comercial Rizofos, de Rizobacter). Los controles negativos consistieron en plantas no inoculadas cultivadas en las mismas condiciones. Los controles fertilizados consistieron en plantas cultivadas en arena volcánica sin el agregado de solución de CO₃(PO₄)₂ y fueron regadas con solución de Hoagland conteniendo KH₂PO₃ 1 mM.

A las 4 semanas pos-inoculación, las plantas fueron cosechadas y se determinó el peso fresco y seco aéreo y radical, longitud radical y número de hojas desarrolladas.

Determinación del efecto de la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno sobre el crecimiento vegetal

Se realizaron dos ensayos que difirieron en la disponibilidad de nitrógeno de las plantas inoculadas:



Ensayo 1: Sin la adición de fertilizante nitrogenado

Las semillas fueron esterilizadas y pregerminadas como fue descrito previamente. Se sembraron en macetas de 360 cm³ conteniendo arena volcánica previamente esterilizada. La inoculación se llevó a cabo una semana después de la siembra. Para ello los cultivos bacterianos crecidos en medio TSB (D.O.₆₂₀=1; 1x10⁹ UFC/ml) fueron centrifugados, lavados y resuspendidos en igual volumen de solución fisiológica. Se inoculó 1 ml de esta suspensión en cada planta. Como control positivo se inoculó con cultivos de *Azospirillum brasilense* Cd (D.O.=1; 1x10⁹ UFC/ml). Los controles negativos consistieron en plantas sin inocular crecidas en idénticas condiciones. El control fertilizado correspondió a macetas regadas con solución de Hoagland con nitrógeno (KNO₃ 5mM y Ca(NO₃)₂ 5 mM). Las macetas se mantuvieron en cámara de cultivo de plantas con condiciones controladas (25°C, con un fotoperiodo de 18 hs luz, 6 hs oscuridad). A las 4 semanas pos-inoculación, las plantas fueron cosechadas y se determinó el peso fresco y seco aéreo, y el número de hojas desarrolladas.

Ensayo 2: Adición de fertilizante nitrogenado en una concentración reducida al 50%.

Las semillas de colza híbrido Hyola 432 fueron esterilizadas como se describió anteriormente. Para su germinación, se colocaron en placas de Petri conteniendo algodón y papel de filtro estériles y se incubaron 48 hs a 28°C en oscuridad. Las semillas germinadas se sembraron en macetas de 360 cm³ conteniendo vermiculita previamente esterilizada. La inoculación se llevó a cabo una semana después de la siembra. Para ello los cultivos bacterianos crecidos en medio TSB a 28°C con agitación a 180 rpm, fueron centrifugados cuando alcanzaron D.O.₆₂₀=1 (1x10⁹ UFC/ml), lavados y resuspendidos en igual volumen de solución fisiológica, inoculándose luego a cada planta 1 ml de cada uno de los diferentes cultivos. Como control positivo se inoculó *Azospirillum brasilense* Cd. Como control fertilizado (N100%) se utilizaron plantas no inoculadas que fueron regadas cada 4 días con solución de Hoagland (conteniendo KNO₃ 5 mM y Ca(NO₃)₂ 5 mM). Las plantas inoculadas con los diferentes aislamientos fueron regadas con solución de Hoagland cuyo contenido de N fue reducido al 50% (KNO₃ 2,5 mM y Ca(NO₃)₂ 2,5 mM). Los controles negativos consistieron en plantas no inoculadas crecidas en las mismas condiciones y regadas con Hoagland con el contenido de N reducido al 50% (N50%). Las macetas se mantuvieron en cámara de cultivo de plantas con condiciones controladas (25°C, con un fotoperiodo de 18 hs luz, 6 hs oscuridad). A las 4 semanas pos-inoculación, las plantas fueron cosechadas y se determinó el peso fresco y seco aéreo y el número de hojas desarrolladas.

Determinación de la capacidad de los aislamientos solubilizadores de fosfato seleccionados de colonizar raíces de colza

Dicha capacidad se analizó en los aislamientos solubilizadores de fosfato que demostraron incrementar el crecimiento vegetal en ensayos en maceta. Las semillas utilizadas para los ensayos correspondieron al híbrido primaveral comercial Hyola 432. Las mismas fueron esterilizadas como se describió previamente, colocadas en placas de Petri conteniendo algodón y papel de filtro estériles, y se incubaron 48 hs a 28°C en oscuridad. Las semillas germinadas se sembraron en macetas de 360 cm³ conteniendo arena volcánica previamente esterilizada, suplementada con 40 ml de Ca₃(PO₄)₂ al 0,2% (Rivas y col. 2007), y se regaron con medio libre de fósforo. Los controles negativos consistieron en plantas crecidas en idénticas condiciones y sin inocular. Las macetas correspondientes al control de fertilización no contenían solución de Ca₃(PO₄)₂ y se regaron cada 4 días con Hoagland con fósforo (KH₂PO₄ 1 mM).

Las macetas se mantuvieron en cámara de cultivo de plantas con condiciones controladas (25°C, con un fotoperiodo de 18 hs luz, 6 hs oscuridad). La inoculación se llevó a cabo una semana después de la siembra. Para ello los cultivos bacterianos fueron crecidos en medio TSB, incubados a 28°C en agitación a 180 rpm. Cuando alcanzaron una D.O.₆₂₀=1 (1x10⁹ UFC/ml), fueron centrifugados, lavados y resuspendidos en igual volumen de solución fisiológica. Se inocularon 3 ml de esta suspensión en cada planta. Las mismas fueron cosechadas a las 4 semanas post-inoculación, las raíces se lavaron suavemente para eliminar la arena volcánica y las bacterias que no se adhirieron a la raíz. Luego fueron pesadas, cortadas en trozos y maceradas con 10 ml de solución fisiológica por cada gramo de raíz. Para determinar el número de UFC/g de raíz, diluciones de esta solución fueron posteriormente sembradas en medio de cultivo sólido NBRIP-BNB descrito por Nauyital (1999), en el cual se evidencia la capacidad solubilizadora de fosfato a partir de la formación de un halo transparente alrededor de la colonia. El recuento de microorganismos viables se realizó por el método de la microgota (Somasegaran y Hoben, 1994) luego de 24 hs de incubación de las placas en estufa a 28°C.

Obtención de exudados radicales estériles de colza

Se diseñó un sistema para la recolección de exudados radicales que consistió en vasos de vidrio conteniendo 100 ml de agua destilada estéril cuyo volumen se cubrió con papel de aluminio perforado (como se muestra en la Figura 7). La radícula (1 cm de largo aproximadamente) de cada semilla esteril germinada (10 en total) se introdujo en cada una de las perforaciones del papel, quedando la semilla ubicada sobre éste. Los vasos recolectores se taparon con Parafilm, se cubrió con papel de aluminio la region donde crecen las raíces para protegerlas de la luz, y se incubaron durante 7 días en cámara de cultivo de plantas con condiciones controladas (25°C, con un fotoperiodo de 18 hs luz, 6 hs oscuridad).

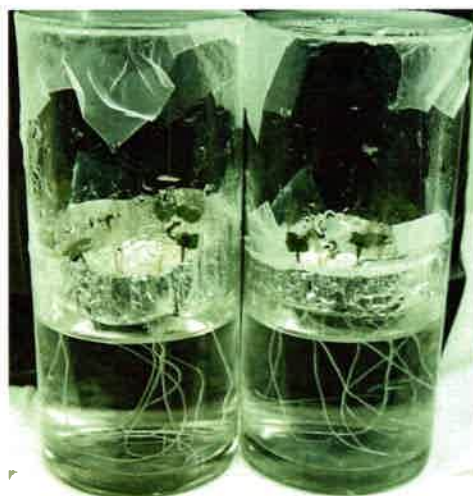


Figura 7. Sistema de recolección de exudados radicales

El agua esteril de los distintos vasos recolectores conteniendo los exudados radicales se mezcló en un único recipiente esteril con el fin de homogeneizar la solución de exudados. Dicha solución fue utilizada en reemplazo del agua destilada, para la preparación del medio TSB, al que se le redujo al 50% o al 10% la concentración de sus componentes (TSBr 50% y TSBr 10%, respectivamente), y se esterilizó mediante filtración a través de membranas de nitrocelulosa de 0,2 μm de diametro de poro.

Estudio de la influencia de los exudados radicales sobre la supervivencia y crecimiento de bacterias solubilizadoras de fosfato

Colonias de bacterias crecidas durante 24 hs a 28°C en placas de Petri conteniendo medio TSA fueron sembradas en el medio líquido TSB. Luego de 18 hs de incubación se adicionó, a 20 ml de medio TSB 50% o TSB 10% con o sin exudados radicales, el volumen del cultivo bacteriano requerido para alcanzar una $D.O_{620}$ inicial de 0,1. Los cultivos fueron incubados a 28°C en agitador rotatorio a 180 rpm y se evaluó su crecimiento determinando espectrofotométricamente la absorbancia a 620 nm cada 2 hs. A las 24 hs de incubación, se evaluó la supervivencia bacteriana mediante el método de la microgota (Somasegaran y Hoben, 1994), sembrando en placas conteniendo medio TSA, las que se incubaron en estufa a 28°C durante 18 hs, y posteriormente se determinó el número de UFC/ml.

Estudio de la influencia de los exudados radicales sobre la capacidad de desarrollar biofilms de bacterias solubilizadoras de fosfato

Se siguió el método descrito por Bais y col (2004). Las bacterias fueron cultivadas en medio TSB 10% y TSB 50% cuyos reactivos fueron disueltos en la solución de exudados radicales (tratamiento) o en agua destilada (control), hasta alcanzar una $D.O_{620}=1$. Los cultivos bacterianos obtenidos se diluyeron con el mismo medio hasta alcanzar una $D.O_{620}=0,1$. Estas suspensiones bacterianas se colocaron en placas de microtitulación de PVC de 96 pocillos (200 μ l por pocillo) y se incubaron a 28°C en agitador rotatorio (180 rpm) durante 24 hs. En un lector de placas se midió la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm. Luego se lavaron los pocillos con agua destilada y las células que quedaron adheridas a los mismos fueron teñidas con solución de Cristal Violeta al 0,1% durante 15 min a temperatura ambiente. El exceso de Cristal Violeta fue eliminado, se lavó nuevamente con agua destilada y se agregaron 200 μ l de alcohol etílico en cada pocillo para resuspender las células teñidas adheridas a las paredes. La formación de biofilm se cuantificó por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 560 nm de la solución contenida en cada pocillo. Con el objetivo de normalizar los valores de absorbancia obtenidos en relación al número de bacterias contenidas en cada pocillo, se calculó el Índice de formación de biofilm (IB) mediante la siguiente fórmula: $IB = D.O_{560}/D.O_{600}$.

Estudio de la influencia de los exudados radicales de colza sobre las señales de quórum sensing

Extracción de AHLs bacterianas

Los autoinductores bacterianos fueron extraídos siguiendo la metodología descrita por Eberhard y col. (1981). Los aislamientos puros crecidos durante 48 hs a 28°C en placas de Petri conteniendo medio TSA fueron inoculados en el medio líquido TSB_r 10% y TSB_r 50% preparado con o sin la solución conteniendo los exudados radicales. Los cultivos fueron incubados a 28°C en agitador rotatorio (180 rpm) durante 48 hs, se trasvasaron 10 ml en un tubo Falco y se adicionaron 10 ml de Acetato de Etilo. Se mezcló utilizando un vortex y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min. Se colocó la fase superior en otro tubo Falco y la fase inferior se resuspendió nuevamente en 10 ml de Acetato de Etilo. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min y se extrajo la fase superior mezclándola con la obtenida anteriormente. La solución obtenida (20 ml de Acetato de Etilo conteniendo las AHLs) se evaporó en rotavapor y se resuspendió en 100 µl de Acetato de Etilo. Los autoinductores contenidos en el extracto fueron evaluados mediante bioensayos que se describen a continuación.

Detección de autoinductores bacterianos

La detección de autoinductores bacterianos se llevó a cabo mediante bioensayos utilizando *Chromobacterium violaceum* CV026 (McClellan y col., 1997) y *Agrobacterium tumefaciens* NT1-pZLR4 (Cha y col. 1998) como biosensores, los cuales revelan la presencia de AHLs a partir de la formación de un pigmento violeta o azul, respectivamente. Los resultados que se obtienen de estos ensayos son semicuantitativos, dado que el diámetro y la intensidad que presentan los halos formados por los pigmentos producidos se corresponden con la cantidad de AHLs detectadas.

- Bioensayo con *Chromobacterium violaceum* CV026.

La sintetasa C_{vi}L de *C. violaceum* interviene en la producción de 3-hexanoil homoserina lactona (C₆-HSL), una molécula de quórum que está involucrada en la producción del pigmento púrpura violaceína. La cepa *C. violaceum* CV026 está mutada en el gen *cvi*L por inserción del transposón mini-Tn5, por lo que es incapaz de producir C₆-HSL y violaceína. La adición de AHLs de cadena corta (C₄-C₈) en forma exógena, restaura la producción de este pigmento.

C. violaceum se cultivó en 5 ml de medio LB (suplementado con Km 50 µg/ml) en agitador rotatorio durante 36 hs a 28°C. Se colocó 1,6 ml de cultivo bacteriano en 40 ml de medio LB semisólido (agar al 0,8 %). Luego se volcó 5 ml de este medio en placas de Petri previamente preparadas, conteniendo 15 ml de medio LB sólido. Posteriormente se sembraron en dichas placas 5 µl del extracto cuyo contenido de AHLs se requería determinar. Las placas se incubaron en estufa a 28°C durante 48 hs y se midieron los diámetros de los halos formados.

-Bioensayo con *Agrobacterium tumefaciens* NT1-pZLR4

A. tumefaciens NT1-pZLR4 es una cepa que carece del plásmido Ti y contiene el plásmido pZLR4 en el que se ha clonado el gen *traR* y una fusión *traG::lacZ*. Esta cepa es incapaz de producir su propio autoinductor, y la fusión *lacZ* sólo se expresa en presencia de moléculas autoinducidas exógenas de cadena larga (C₁₀-C₁₈).

A. tumefaciens NT1-pZLR4 se cultivó en 5 ml de medio YEMA (suplementado con Gm 30 µg/ml) en agitador rotatorio durante 48 hs a 28° C. Se colocaron 4 ml de cultivo en 40 ml de medio YEMA semisólido (agar al 0,8 %), y se le adicionaron 400 µl de Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido; 20 mg/ml en N,N-dimetilformamida) y 16 µl de Gm (80 µg/ml). Se prepararon placas de Petri con 15 ml de medio YEMA, y sobre ellas se vertieron 5 ml del medio YEMA semisólido conteniendo las bacterias, el Xgal y el antibiótico. Al solidificar se sembraron 5 µl de los extractos conteniendo las AHLs. Las placas se incubaron en estufa a 28°C durante 48 hs y se midieron los diámetros de los halos formados.

Determinación del efecto de la inoculación de las semillas sobre su germinación

Los ensayos de germinación se realizaron según Gholami y col., (2009) con algunas modificaciones. Los cultivos bacterianos de 24 hs de crecimiento en medio TSB fueron centrifugados y resuspendidos en un volumen de solución fisiológica (CINa 0,9%) hasta que alcanzaron una D.O.₆₂₀=1 (1x10⁹ UFC/ml). En cada una de las suspensiones microbianas se sumergieron 50 semillas estériles durante 20 min. Luego se colocaron en placas de Petri conteniendo agar al 1,5% y se incubaron en estufa a 28°C. Se determinó el número de semillas germinadas cada 24 hs durante 7 días y, a este tiempo se midió la longitud radical y aérea (desde la corona de la raíz hasta el ápice del tallo). Los controles consistieron en semillas inoculadas con solución fisiológica estéril e incubadas en idénticas condiciones.

Preparación de inoculantes con bacterias solubilizadoras de fosfato y fijadoras de nitrógeno para su evaluación en ensayos a campo

Los inoculantes se prepararon a partir de los aislamientos solubilizadores de fosfato *Bacillus* sp. LTAD-52, *Bacillus* sp. LRCP-2, *Bacillus* sp. LRCP-3, *Bacillus* sp. LRCP-4, *Arthrobacter* sp. LRCP-11, *Pantoea* sp. LRCP-17 y *Serratia* sp. LRCP-29. Además, a partir de los resultados obtenidos en el ensayo realizado in vitro para estudiar el efecto de la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno se seleccionaron para evaluar a campo los aislamientos *Bacillus* sp. LTAD-52, *Bacillus* sp. LTAP-43, *Arthrobacter* sp. LTAP-41, *Bacillus* sp. LTAP-42, *Bacillus* sp. LRCP-4 y *Arthrobacter* sp. LRCP-11. Los aislamientos seleccionados se sembraron en 25 ml de medio TSB y se incubaron a 28° C en agitador rotatorio (180 rpm). Cuando alcanzaron una D.O.₆₂₀=1 se trasvasaron a un Erlenmeyer de 2 litros conteniendo 500 ml de medio TSB y se incubaron en las mismas condiciones. Cuando los cultivos alcanzaron un recuento igual o superior a 1×10^9 UFC/ml, se trasvasaron a una vejiga esteril de 250 ml y se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

Ensayos a campo para evaluar el efecto de la inoculación de semillas de colza con bacterias solubilizadoras de fosfato y fijadoras de nitrógeno

Los ensayos se desarrollaron en el Campo de la Chacra experimental de Barrow (INTA) en Tres Arroyos (asistencia técnica a cargo de la Ing. Agr Lilita Iriarte). Se realizaron dos ensayos simultáneos, uno en el que se inocularon las cepas solubilizadoras de fosfato y otro las cepas fijadoras de nitrógeno. El tamaño de las parcelas utilizadas para todos los ensayos fue de 8 surcos de 6 m de largo separados por 32 cm. El ensayo de inoculación con solubilizadores de fosfato se sembró el 12 de Junio, y el de fijadores de nitrógeno el 19 de Junio de 2013. En ambos ensayos se utilizó semillas Bioaureo 2386, previamente inoculadas mezclando 800 ml de inoculante por cada 100 Kg de semillas. Los distintos tratamientos se conformaron de la siguiente manera:

Inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfato

1. Testigo Fertilizado con fosfato diamónico 90 kg/ha, sin Inocular (Control positivo).
2. Testigo Sin fósforo, sin Inocular (Control negativo)
3. Sin fósforo, inoculado con *Bacillus* sp. LTAD-52
4. Sin fósforo, inoculado con *Serratia* sp. LRCP-29
5. Sin fósforo, inoculado con *Bacillus* sp. LRCP-4
6. Sin fósforo, inoculado con *Pantoea* sp. LRCP-17
7. Sin fósforo, inoculado con *Bacillus* sp. LRCP-2
8. Sin fósforo, inoculado con *Bacillus* sp. LRCP-3
9. Sin fósforo, inoculado con *Arthrobacter* sp. LRCP-11

Inoculación con bacterias fijadores de nitrógeno

1. Testigo Fertilizado con 60 Kg N/ha, sin Inocular (N 100%)
2. Testigo Fertilizado con 30 Kg N/ha , sin Inocular (N 50%)
3. Fertilizado con 30 Kg N/ha, inoculado con *Bacillus* sp. LTAD-52
4. Fertilizado con 30 Kg N/ha, inoculado con *Bacillus* sp. LTAP-43
5. Fertilizado con 30 Kg N/ha, inoculado con *Arthrobacter* sp. LTAP-41
6. Fertilizado con 30 Kg N/ha, inoculado con *Bacillus* sp. LTAP- 42
7. Fertilizado con 30 Kg N/ha, inoculado con *Bacillus* sp LRCP-4
8. Fertilizado con 30 Kg N/ha, inoculado con *Arthrobacter* sp. LRCP-11

Durante el desarrollo del cultivo (Julio a Diciembre de 2013) se evaluaron las siguientes variables: a) producción de materia seca en el estadio Roseta (B6) y floración (F) y Madurez (G); b) contenido de fósforo y nitrógeno en hoja (Roseta B4). En la cosecha se evaluó: a) rendimiento en grano por hectárea; b) peso de 1000 granos; y, c) índice de cosecha (I.C.)



Efecto de la inoculación de colza sobre el crecimiento y desarrollo de nódulos en plantas de soja, y la micorrización de sus raíces.*Crecimiento e inoculación de plantas de soja*

Con el objetivo de estudiar el efecto de la inoculación de colza en el crecimiento, nodulación y micorrización de plantas de soja, cultivo que le sigue a la colza en la rotación, se tomaron muestras de suelo del ensayo llevado a cabo previamente en el campo de la Chacra Experimental de Barrow (INTA) para evaluar el efecto de la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno. Dichas muestras consistieron en suelo extraído de parcelas en las que no se había sembrado colza, y suelo de parcelas en las que se sembró colza sin inocular o inoculada. Las muestras de suelo se mezclaron con vermiculita en una proporción 1:1 y se dispusieron en macetas (360cm³). Para su esterilización, las semillas de soja fueron sumergidas en etanol (70%) durante 1 minuto e hipoclorito de sodio (25%) durante 5 min, enjuagadas seis veces con agua destilada estéril (English y col., 2009). Las semillas estériles se colocaron en placas de Petri con algodón y papel absorbente en estufa a 28°C durante 3 días en la oscuridad. Cuando las raíces de las plántulas alcanzaron una longitud de 15-20 mm, éstas fueron transferidas a macetas (una por maceta). Las macetas en las que crecieron las plantas de soja contenían:

1. Muestras de suelo provenientes de lotes sin cultivo de colza.
2. Muestras de suelo provenientes de lotes en los que se había cultivado colza sin inocular.
3. Muestras de suelo provenientes de lotes en los que se había cultivado colza inoculada con *Arthrobacter* sp. LRCP-11.
4. Muestras de suelo provenientes de lotes en los que se había cultivado colza inoculada con *Bacillus* sp. LRCP-4.

Al momento de la siembra se adicionó al suelo de cada maceta 1ml de cultivo de *Bradyrhizobium japonicum* E109 con D.O₆₂₀=1 (1x10⁹ UFC/ml). Las plantas fueron regadas con solución Hoagland sin nitrógeno cada 4 días, y mantenidas en cámara de cultivo con condiciones controladas (25°C, con un fotoperiodo de 18 hs luz, 6 hs oscuridad) durante dos meses. A este tiempo, la mitad de las plantas obtenidas fueron utilizadas para evaluar el número y peso seco de nódulos, el porcentaje de nódulos rojos, y el peso fresco y seco aéreo y radicular. Las raíces de la mitad restante fueron conservadas a -20°C para la posterior evaluación de su micorrización.

Evaluación de la micorrización de las raíces de plantas de soja

-Tinción de las raíces

Las raíces de soja conservadas a -20°C fueron sumergidas en KOH 10% y calentadas a 90°C por 1 hora. Posteriormente se lavaron con abundante agua y fueron sumergidas en una solución 1:1 de KOH 10% y H₂O₂ 10% durante 5 min. Nuevamente se lavaron con abundante agua y se sumergieron en HCl 1% por 15 min para acidificar las raíces. Luego de descartar el HCl se sumergieron en azul de tripan al 0,05% a 90°C por 15 min. Luego se retiró el colorante, se lavó y se dejó reposar toda la noche en lactoglicerol (ácido láctico:glicerol:agua 1:1:1), previo a su observación microscópica (Brundrett y col., 1996).

-Determinación del porcentaje de colonización

En un portaobjeto, se colocaron 10 segmentos de aproximadamente 1 cm de longitud de cada raíz, en forma paralela. Sobre las raíces se adicionaron 2 gotas de lactoglicerol y se observó al microscopio con aumento de 400X.

Se asignó el valor de “1” para la presencia de hifas, vesículas y/o arbuscúlos y “0” para la ausencia de dichas estructuras.

El porcentaje de colonización por ectomicorrizas se obtuvo utilizando las siguientes fórmulas:

Porcentaje de Colonización total = (Nº de segmentos colonizados) / (Nº de segmentos totales) x 100

Porcentaje de Colonización por vesículas = (Nº de segmentos con vesículas) / (Nº de segmentos totales) x 100

Porcentaje de Colonización por arbuscúlos = (Nº de segmentos con arbuscúlos) / (Nº de segmentos totales) x 100 (Brundrett y col., 1996).

Diseño experimental y análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante A.N.A.V.A. y separación de medias según el test DMS de Fisher (5%) usando el software estadístico INFOSTAT (Di Rienzo y col. 2014)

Para los ensayos de inoculación con cepas fijadoras de Nitrógeno en maceta se realizaron 2 réplicas independientes con 5 repeticiones cada una.



Para evaluar el efecto de los exudados sobre el crecimiento y supervivencia de los microorganismos, se realizaron 2 réplicas independientes con tres repeticiones cada una.

Para evaluar el efecto de los exudados sobre la formación de biofilm se realizaron 2 réplicas independientes con 21 repeticiones cada una.

Para evaluar el efecto de los exudados sobre la producción de señales de *quórum sensing* se realizaron 2 réplicas independientes con 3 repeticiones cada una

Los ensayos a campo se realizaron en bloques completamente aleatorizados con 3 repeticiones.

Para evaluar el efecto de la inoculación de colza sobre el desarrollo de nódulos, en plantas de soja se realizaron 2 replicas independientes con 5 repeticiones cada una.

Para evaluar el efecto de la inoculación de colza sobre la micorrización de raíces de soja se realizaran dos replicas independientes con 3 repeticiones cada una.

CAPITULO 4

Resultados y discusión

Aislamiento de bacterias epífitas y endófitas

Se recolectaron plantas de un lote de producción comercial ubicado en la localidad de Río Cuarto (Córdoba) y otro en la localidad de Tres Arroyos (Buenos Aires). Debido a la zona en la que se encuentran cada uno de estos lotes, las semillas utilizadas correspondieron a una variedad de tipo primaveral e invernal respectivamente. Se procesaron 20 plantas de cada sitio, de las cuales 10 se utilizaron para el aislamiento de bacterias epífitas y 10 para endófitas.

A partir de la metodología descrita anteriormente se lograron aislar 40 morfotipos bacterianos diferentes entre los dos sitios muestreados. Dichos aislamientos fueron evaluados en sus características morfológicas y tintoriales de acuerdo a la clasificación de Gram. Las proporciones observadas correspondientes a cada morfotipo fueron: 28,2% bacilos esporulados Gram (+); 35,9% bacilos no esporulados Gram (+); 5,1% cocos Gram (+) y 30,8% bacilos Gram (-). El total de bacterias Gram (+) aisladas fue del 69,2% (Tabla 4 y Figura 8). Tanto en la población de bacterias epífitas como endófitas, se observó un marcado predominio de aislamientos Gram (+). No obstante, los cocos Gram (+) solamente fueron aislados en asociación epífita. Estudios realizados en plantas de colza por Germida y col. (1998) también demostraron que existe un marcado predominio de Gram (+) en la población de endófitos, pero no hallaron diferencias en la proporción de Gram (+) y Gram (-) en la población de epifitos.

Estos resultados son similares a los informados para poblaciones bacterianas aisladas de la rizósfera de otras plantas tales como gramíneas de la especie *Brachiaria ruziziensis* y las leguminosas *Cajanus cajan* (da Silva y Nahas, 2002) y *Glycine max* (Cattelan y col. 1998). También se informaron resultados similares para aislamientos provenientes de distintos suelos de Argentina (Sagardoy y Salerno, 1983). Contrariamente, Rouatt y Katznelson (1961) encontraron una prevalencia de bacterias Gram (-) en suelos cultivados con trigo. Todos estos antecedentes indicarían que las comunidades bacterianas asociadas a plantas son diversas, y que su composición está influenciada por el órgano vegetal del que se aíslan, el estado ontogénico de la planta, el tipo de cultivo y las condiciones edafocológicas del lugar (da Silva y Nahas, 2002; Garbeva y col., 2004; De Campos y col., 2012; Croes y col., 2015).

Tabla 4. Procedencia, colonización vegetal y características morfológicas y tintoriales de los aislamientos obtenidos de plantas de *Brassica napus*.

Aislamiento	Morfología	Esporas	Gram	Colonización	Procedencia
LRCP-1	Bacilo	+	+	Epífito	Río Cuarto
LRCP-2	Bacilo en cadena	+	+	Epífito	Río Cuarto
LRCP-3	Bacilo	+	+	Epífito	Río Cuarto
LRCP-4	Bacilo	+	+	Epífito	Río Cuarto
LRCP-5	Bacilo	-	-	Epífito	Río Cuarto
LRCP-6	Bacilo	-	-	Epífito	Río Cuarto
LRCP-7	Coco en racimo	-	+	Epífito	Río Cuarto
LRCP-9	Bacilo corto	-	+	Epífito	Río Cuarto
LRCP-10	Coco en racimo	-	+	Epífito	Río Cuarto
LRCP-11	Bacilo corto	-	variable	Epífito	Río Cuarto
LRCD-13	Bacilo delgado y largo	-	+	Endófito	Río Cuarto
LRCD-14	Bacilo corto	-	+	Endófito	Río Cuarto
LRCD-16	Bacilo	-	-	Endófito	Río Cuarto
LRCP-17	Bacilo corto	-	+	Endófito	Río Cuarto
LRCD-22	Bacilo corto	-	-	Endófito	Río Cuarto
LRCD-23	Bacilo corto	-	-	Endófito	Río Cuarto
LRCD-25	Bacilo	-	-	Endófito	Río Cuarto
LRCP-29	Cocobacilo	-	-	Endófito	Río Cuarto
LRCD-32	Bacilo corto	-	+	Endófito	Río Cuarto
LRCP-37	Cocobacilo	-	-	Epífito	Río Cuarto
LRCP-40	Bacilo	-	+	Epífito	Río Cuarto
LTAP-41	Bacilo corto	-	+	Epífito	Tres Arroyos
LTAP-42	Bacilo	-	+	Epífito	Tres Arroyos
LTAP-43	Bacilo	-	-	Epífito	Tres Arroyos
LTAP-44	Bacilo	-	+	Epífito	Tres Arroyos
LTAP-46	Bacilo	-	+	Epífito	Tres Arroyos
LTAP-48	Bacilo en cadena	+	+	Epífito	Tres Arroyos
LTAP-49	Bacilo en cadena	-	-	Epífito	Tres Arroyos
LTAP-50	Bacilo corto	+	+	Epífito	Tres Arroyos
LTAD-52	Bacilo corto	-	-	Endófito	Tres Arroyos
LTAD-53	Bacilo	+	+	Endófito	Tres Arroyos
LTAD-54	Bacilo en cadena	-	+	Endófito	Tres Arroyos
LTAD-55	Bacilo	+	-	Endófito	Tres Arroyos
LTAD-58	Bacilo corto de a pares	-	+	Endófito	Tres Arroyos
LTAD-59	Bacilo	-	+	Endófito	Tres Arroyos
LTAD-60	Bacilo corto	+	+	Endófito	Tres Arroyos
LTAD-61	Bacilo	-	+	Endófito	Tres Arroyos
LTAD-62	Bacilo en cadena	+	+	Endófito	Tres Arroyos
LTAD-63	Bacilo en cadena	+	+	Endófito	Tres Arroyos
LTAP-65	Bacilo	-	+	Epífito	Tres Arroyos

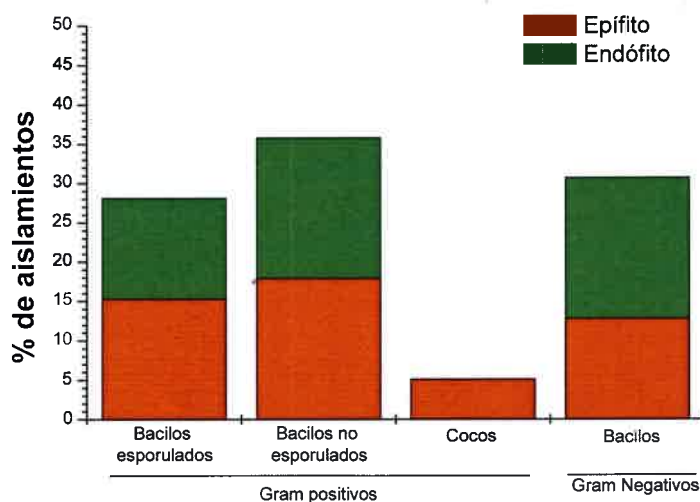


Figura 8. Proporción de morfitipos asociados a *Brassica napus*.

Caracterización bioquímica

Según nuestro conocimiento, hasta la fecha no se han publicado estudios sobre diversidad de bacterias asociadas al cultivo de colza en nuestro país. Por lo tanto, es importante determinar los géneros bacterianos que se encuentran asociados a dicho cultivo. Con tal fin, se realizaron pruebas bioquímicas a cada grupo de morfitipos obtenidos. De los 32 aislamientos analizados, 8 no pudieron ser identificados. En los restantes, se lograron identificar 8 géneros diferentes (*Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Lactobacillus* y *Staphylococcus*), de los cuales *Bacillus* y *Corynebacterium* se encuentran representados por un mayor número de aislamientos (Tabla 5, Tabla 6 y Figura 9). La mayoría de los géneros se encontraron tanto en asociación epífita como endófito, a excepción de *Aeromonas* y *Staphylococcus* que se identificaron únicamente como endófito y epífita, respectivamente (Fig. 10).

Tabla 5. Identificación de los aislamientos basada en pruebas bioquímicas.

Aislamiento		Pruebas Bioquímicas									
Bacilos Gram (-)	Cat	Oxi	Oflu	OFlac	Indol	H ₂ S	Mov	RM	VP	Ureasa	
LRCP-6	+	+	-/-	s/d	-	-	+	s/d	-	s/d	
LRCD-16	-	-	s/d	-/-	-	-	+	+	-	-	
LRCD-22	+	-	s/d	-/-	-	-	+	+	-	-	
LRCD-25	+	-	s/d	-/-	-	-	+	+	-	-	
LTAP-43	-	+	-/-	s/d	-	-	-	s/d	-	s/d	
LTAP-49	+	-	s/d	-/-	-	-	+	+	-	-	
LTAD-52	+	+	+/+	-/-	-	-	+	+	+	-	
LTAD-59	-	+	-/-	s/d	-	-	+	s/d	-	s/d	
LRCP-29	+	-	s/d	+/+	-	-	+	+	+	+	
LRCP-37	+	-	s/d	+/+	-	-	+	+	+	+	
Cocos Gram (+)		Cat	Bac	Coag	Nov						
LRCP-7	+	+	-	-							
LRCP-10	+	+	-	+							
Bacilos Gram (+)		Esp	Cat								
LRCP-1	+	+									
LRCP-2	+	+									
LRCP-3	+	+									
LRCP-4	+	+									
LTAD-63	+	+									
LTAP-48	+	-									
LTAD-62	+	-									
LRCP-9	-	+									
LRCD-14	-	+									
LRCP-17	-	+									
LTAP-41	-	+									
LTAP-42	-	+									
LTAP-46	-	+									
LTAD-53	+	+									
LTAD-55	+	+									
LTAD-60	+	+									
LTAP-50	+	+									
LTAD-58	-	+									
LTAD-61	-	-									
LTAP-44	-	-									

Cat: Catalasa
 Oxi: Oxidasa
 OFlu: Fermentación de Glucosa
 OFlac: Fermentación de Lactosa

H₂S: Producción de Sulfídrico
 Mov: Movilidad
 RM: Rojo Metilo
 VP: VogesProskauer

Bc: Resistencia a la Bacitracina
 Nov: Resistencia a la Novobiocina
 Coag: Coagulasa
 Esp: Formación de esporas

Tabla 6. Géneros correspondientes a los aislamientos de *Brassica napus* de acuerdo al análisis fenotípico.

Aislamiento	Género	Aislamiento	Género
LRCP-1	<i>Bacillus</i>	LRCP-40	No identificado
LRCP-2	<i>Bacillus</i>	LTAP-41	<i>Corynebacterium</i>
LRCP-3	<i>Bacillus</i>	LTAP-42	<i>Corynebacterium</i>
LRCP-4	<i>Bacillus</i>	LTAP-43	<i>Pseudomonas</i>
LRCP-5	No identificado	LTAP-44	<i>Lactobacillus</i>
LRCP-6	<i>Pseudomonas</i>	LTAP-46	<i>Corynebacterium</i>
LRCP-7	<i>Staphylococcus</i>	LTAP-48	<i>Bacillus</i>
LRCP-9	<i>Corynebacterium</i>	LTAP-49	<i>Serratia</i>
LRCP-10	<i>Staphylococcus</i>	LTAP-50	<i>Bacillus</i>
LRCP-11	No identificado	LTAD-52	<i>Aeromonas</i>
LRCD-13	No identificado	LTAD-53	<i>Bacillus</i>
LRCD-14	<i>Corynebacterium</i>	LTAD-54	No identificado
LRCD-16	<i>Serratia</i>	LTAD-55	<i>Bacillus</i>
LRCP-17	<i>Corynebacterium</i>	LTAD-58	<i>Corynebacterium</i>
LRCD-22	<i>Serratia</i>	LTAD-59	<i>Pseudomonas</i>
LRCD-23	No identificado	LTAD-60	<i>Bacillus</i>
LRCD-25	<i>Serratia</i>	LTAD-61	<i>Lactobacillus</i>
LRCP-29	<i>Enterobacter</i>	LTAD-62	<i>Bacillus</i>
LRCD-32	No identificado	LTAD-63	<i>Bacillus</i>
LRCP-37	<i>Enterobacter</i>	LTAD-65	No identificado

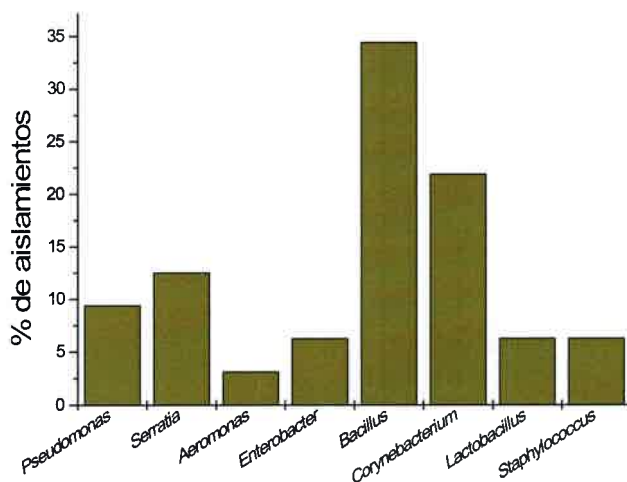


Figura 9. Porcentaje de aislamientos pertenecientes a los distintos géneros asociados a *Brassica napus*.

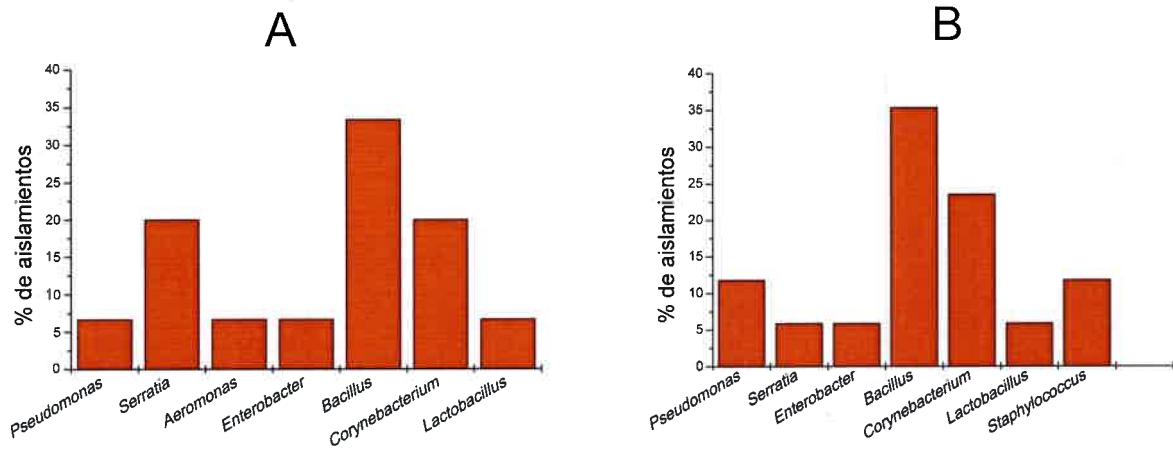


Figura 10. Porcentaje de aislamientos endófitos (A) y epífitos (B) correspondientes a los distintos géneros identificados.

Los géneros bacterianos *Aeromonas*, *Lactobacillus* y *Serratia* no han sido previamente identificados en estudios de diversidad bacteriana en la rizosfera de colza. En cambio se ha reportado la presencia de los géneros *Bacillus* (de Freitas y col., 1997; Germida y col., 1998; Siciliano y Germida, 1999), *Pseudomonas* (de Freitas y col., 1997; Germida y col., 1998; Siciliano y Germida, 1999; Bertrand y col., 2001), *Staphylococcus* (de Freitas y col., 1997), *Enterobacter* y *Corynebacterium* (Germida y col., 1998; Siciliano y Germida 1999).

Determinación de la capacidad de solubilización de fosfato y de fijación de nitrógeno

La solubilización de fosfatos y la fijación de nitrógeno son los principales mecanismos de promoción directa por los cuales las PGPRs pueden afectar el crecimiento vegetal (Glick, 1995). Además, tanto el nitrógeno como el fósforo, son nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas. Su habitual deficiencia en el suelo contribuye al reducido rendimiento de algunos cultivos. Por lo tanto, dichas capacidades fueron evaluadas en la colección de aislamientos obtenidos.

Se encontró que, del total de los aislamientos analizados, 14 (37,8%) fueron capaces de solubilizar fosfato. De éstos, 9 habían sido aislados de la población bacteriana epífita, lo cual sugiere que dicha actividad predomina en los microorganismos que habitan la rizósfera. Por otra parte, se identificaron 22

aislamientos fijadores de nitrógeno (62,1%) los cuales provenían, en proporciones similares, tanto del interior como de la superficie de los tejidos vegetales. Solo 7 aislamientos (19,9%) mostraron poseer ambas capacidades (Tabla 7 y Fig. 11), mientras que 4 aislamientos (8,6%) no presentaron ninguna de las dos actividades evaluadas.

Tabla 7. Capacidad de solubilizar fosfatos y de crecer en medios de cultivo libres de nitrógeno (JMV, NFB y JNF) de los aislamientos asociados a *Brassica napus*.

Aislamiento	Solubilización de P	Medio JMV	Medio NFB	Medio JNF	Aislamiento	Solubilización de P	Medio JMV	Medio NFB	Medio JNF
LRCP-1	-	+	+	+	LRCP-40	s/d	s/d	s/d	s/d
LRCP-2	+	-	-	-	LTAP-41	-	-	+	+
LRCP-3	+	-	+	+	LTAP-42	+	+	+	+
LRCP-4	+	-	+	+	LTAP-43	-	-	+	+
LRCP-5	s/d	+	+	+	LTAP-44	-	-	-	+
LRCP-6	-	-	+	-	LTAP-46	-	-	+	+
LRCP-7	+	-	-	-	LTAP-48	+	-	-	-
LRCP-9	-	+	+	+	LTAP-49	-	-	-	-
LRCP-10	+	-	-	-	LTAP-50	-	-	+	+
LRCP-11	+	+	+	+	LTAD-52	+	-	+	+
LRCD-13	s/d	-	-	-	LTAD-53	-	-	+	+
LRCD-14	+	-	-	-	LTAD-54	s/d	s/d	s/d	s/d
LRCD-16	-	-	+	-	LTAD-55	-	-	+	+
LRCP-17	+	-	+	-	LTAD-58	-	-	-	-
LRCD-22	-	-	+	+	LTAD-59	-	-	+	+
LRCD-23	s/d	-	-	-	LTAD-60	+	-	+	+
LRCD-25	-	-	+	+	LTAD-61	-	-	-	-
LRCP-29	+	-	-	-	LTAD-62	-	-	-	-
LRCD-32	s/d	-	-	-	LTAD-63	-	-	+	-
LRCP-37	+	-	-	-	LTAD-65	s/d	s/d	s/d	s/d

+ Presencia de halo/crecimiento

-Ausencia de halo/crecimiento

s/d: Sin datos



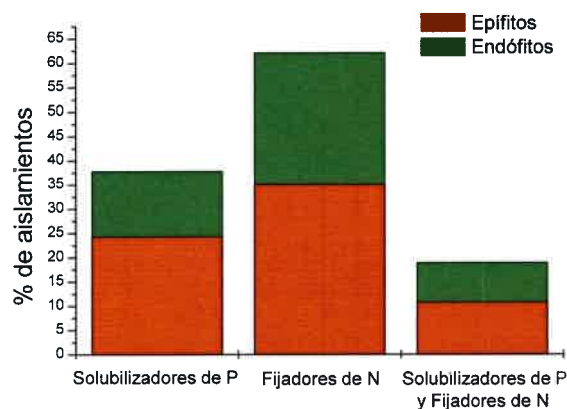


Figura 11. Proporción de bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfato asociadas a *Brassica napus*.

La mayoría de los aislamientos capaces de solubilizar fosfato fueron epífitos, a diferencia de los fijadores de nitrógeno que se encontraron prácticamente en igual proporción tanto en el ambiente epífito como en el endófito (Fig. 11). Desde un punto de vista químico, físico y biológico, el entorno endófito difiere del epífito (Fageria y Stone 2006). Los exudados de las plantas ricos en materia orgánica mejoran la calidad nutricional de la rizósfera en comparación con la del suelo. Sin embargo, los organismos rizosféricos deben ser capaces de superar la competencia del suelo y las variables ambientales para sobrevivir. En contraste, el medio ambiente endofítico es más estable y uniforme, y se ve menos afectado por los cambios ambientales. No obstante, solo algunos microorganismos son capaces de colonizar el interior de la raíz debido a la especificidad de dicha interacción (Lacava y col., 2004; Gray y Smith, 2005; Hallmann y Berg, 2007). Si bien bacterias endófitas o epífitas pueden poseer la capacidad de promover el crecimiento vegetal mediante mecanismos similares, aún no se conoce con precisión cuál de estos ambientes puede resultar más eficiente en la promoción del crecimiento vegetal. (Vessey, 2003; Santi Ferrara y col., 2012).

La comparación de la capacidad de los aislamientos de solubilizar fosfato se realizó midiendo el halo de solubilización formado por cada uno de ellos cuando crece en medio NBRIP-BNB. Los halos de mayor diámetro fueron formados por los aislamientos epífitos LRCP-17, LRCP-29 y LRCP-37 (Fig. 12).

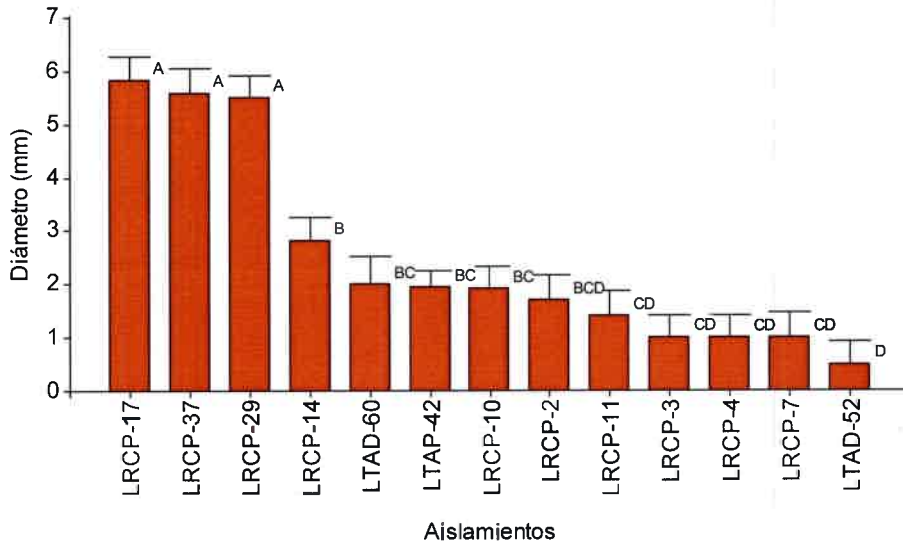


Figura 12. Medición del halo de solubilización de fosfato. Los datos representan la media ± E.S. de dos réplicas independientes con tres repeticiones cada una. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test DMS de Fisher.

De los resultados obtenidos se concluye que los aislamientos solubilizadores de fosfatos se ubicaron en los géneros *Staphylococcus* y *Enterobacter*, los fijadores de nitrógeno en los géneros *Pseudomonas*, *Serratia* y *Lactobacillus*, mientras que aquellos que demostraron ambas capacidades se encontraron en los géneros *Bacillus*, *Corynebacterium* y *Aeromonas* (Fig. 13).

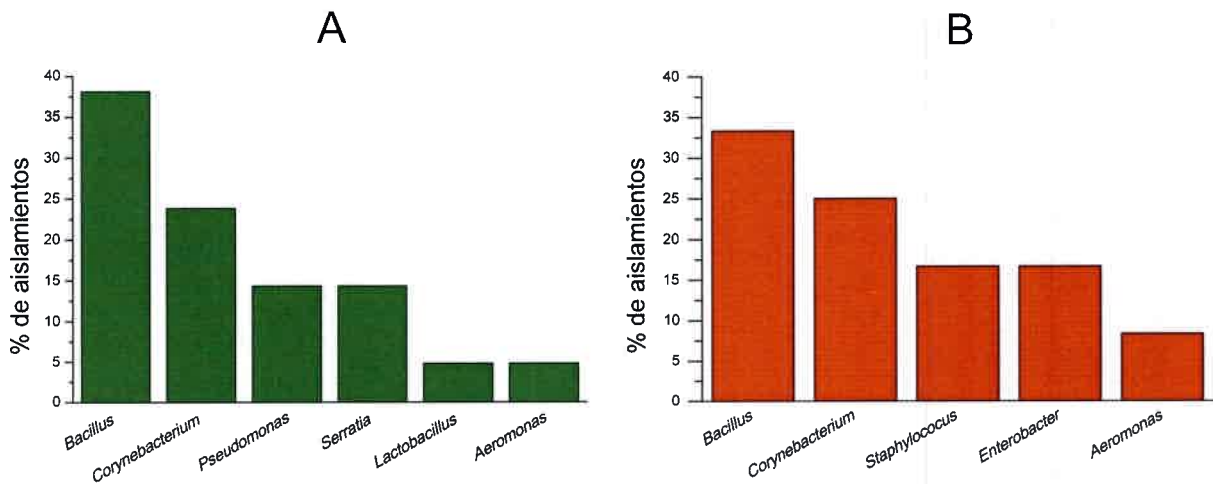


Figura 13. Diversidad de bacterias asociadas a *Brassica napus* capaces de fijar nitrógeno (A) y solubilizar fosfato (B).

Efecto de la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfato sobre el crecimiento vegetal

La capacidad de las PGPRs para solubilizar fosfato mineral, ha sido de gran interés en la microbiología agrícola ya que puede aportar a la disponibilidad de fósforo en el suelo. Dicha capacidad representa un posible mecanismo que contribuiría a la promoción del crecimiento de plantas en condiciones de campo (Verma y col. 2001; Rodríguez y col., 2006)

Los aislamientos obtenidos en este trabajo, y que presentaron actividad solubilizadora de fosfato, fueron inoculados en plantas de colza para evaluar su efecto sobre el crecimiento de la planta. En este ensayo también se incluyeron aislamientos nativos obtenidos de plantas de maní cultivadas en suelos de la provincia de Córdoba, capaces de solubilizar fosfato y que promovieron el crecimiento de esta leguminosa en ensayos en invernáculo (Taurian y col., 2010). Dichos aislamientos fueron identificados como *Klebsiela* sp. NTI31, *Serratia* sp. S119 y *Serratia* sp. J49. Además se utilizó como control una cepa de *Pseudomonas fluorescens*, solubilizadora de fosfato y empleada como inoculante (Rizofost, de Rizobacter) para maíz y trigo.

Los parámetros de crecimiento evaluados fueron peso fresco y seco aéreo. El número de hojas desarrolladas a las cinco semanas posteriores a la siembra también fue evaluado a los fines de conocer si las plantas alcanzaron el estadio de roseta. Es importante que dicho estadio se alcance a tiempos cortos ya que ello contribuye a una mejor captación de luz, menor evaporación de agua, mejor control de malezas y mayor resistencia a las adversidades climáticas (Iriarte y Valetti, 2008).

El peso fresco aéreo de plantas inoculadas con 13 de los 17 aislamientos evaluados se vio incrementado con respecto al control fertilizado. Con respecto al peso seco, la biomasa de plantas inoculadas con 7 de dichos aislamientos alcanzó valores similares a los de plantas fertilizadas, y significativamente superiores a los de plantas sin inocular ni fertilizar (control negativo) (Fig. 14 y Fig. 15).

El incremento del peso fresco aéreo, con respecto al control fertilizado, producido en las plantas inoculadas, no fue observado en la producción de biomasa. Dicho incremento podría deberse a una mayor incorporación de agua como consecuencia de un aumento en la superficie de absorción radicular. Esta hipótesis no se pudo confirmar debido a que, en el sistema de cultivo de plantas utilizado, la raíz

presentó una frágil estructura, lo que imposibilitó su completa extracción y, por lo tanto, la obtención de datos confiables de su peso seco.

En cuanto al número de hojas, si bien se observó un incremento significativo en plantas inoculadas con la mayoría de los aislamientos comparado con plantas sin inocular, todas alcanzaron el estadio de roseta al momento de la cosecha. Más aún, el control fertilizado desarrolló el mismo número de hojas que el control negativo. A partir de estos resultados, y considerando que no todos los aislamientos que incrementaron el número de hojas tuvieron un efecto positivo con respecto al peso seco aéreo (Fig. 14), podemos inferir que los aislamientos evaluados no promueven el desarrollo de la planta de colza.

Existen algunos antecedentes bibliográficos que demuestran que la inoculación de PGPRs incrementa el crecimiento de plantas de colza. Así, por ejemplo, Kloepper (1988) y Bertrand y col. (2001) describieron un efecto promotor del crecimiento cuando se inocula plantas de canola con aislamientos endófitos identificados como *Pseudomonas*. De Freitas (1997) informó un incremento en el número de vainas y en el peso de semillas con la inoculación de los aislamientos solubilizadores de fosfato de las especies *B. thurigiensis* y *Xanthomonas maltophilia*, aunque los autores no pudieron atribuir el efecto a dicha actividad.

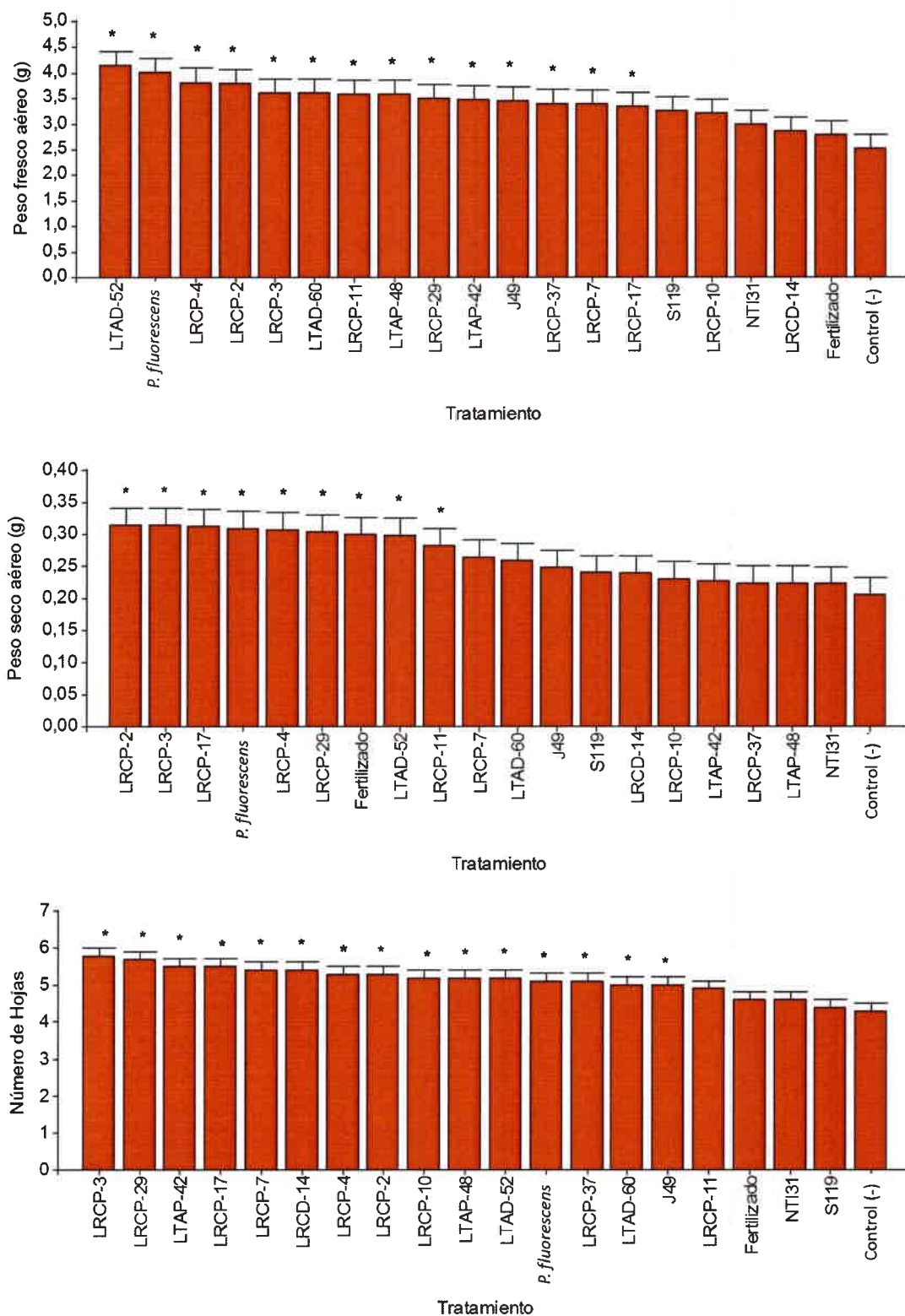


Figura 14. Efecto de la inoculación de bacterias solubilizadoras de fosfato sobre parámetros de crecimiento del sistema aéreo de *Brassica napus*. Los datos representan la media \pm E.S. de dos réplicas independientes con cinco repeticiones cada una. * indica diferencias significativas (p<0,05) según el test DMS de Fisher con respecto al control negativo.



Figura 15. Plantas de colza inoculadas con aislamientos solubilizadores de fosfato. Plantas controles y plantas inoculadas con aislamientos que incrementaron el peso seco aéreo.

Control (-): Plantas sin inocular regadas con Hoagland sin fósforo.

Control Fertilizado: Plantas sin inocular regadas con Hoagland con fósforo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en estos ensayos, se seleccionaron las cepas solubilizadoras de fosfato LTAD-52, LRCP-2, LRCP-3, LRCP-4, LRCP-17, LRCP-29, y LRCP-11 para secuenciar el gen *16S rARN* con el fin de confirmar, mediante una técnica molecular, el género al cual pertenecen.



Efecto de la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno sobre el crecimiento vegetal

La fijación de nitrógeno es uno de los principales mecanismos por el cual las bacterias PGPRs incrementan el crecimiento de las plantas (Glick, 1995). Sin embargo, se han realizado pocos estudios para evaluar si la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno mejora el crecimiento y rendimiento del cultivo de colza.

Los aislamientos que presentaron actividad fijadora de nitrógeno (Tabla 7) fueron inoculados en plantas de colza para evaluar el efecto de dicha actividad sobre su crecimiento. Como cepa control se utilizó *Azospirillum brasilense* Cd. Los parámetros de crecimiento que se evaluaron fueron peso seco y fresco aéreo, y número de hojas desarrolladas luego de 5 semanas de incubación en cámara de cultivo de plantas. Como era de esperar, se observó una marcada disminución del crecimiento en las plantas no inoculadas (control negativo) con respecto al control fertilizado. Sin embargo, en las condiciones utilizadas en este ensayo, ninguno de las bacterias inoculadas, incluido *A. brasilense* Cd, incrementó el crecimiento de las plantas (Fig. 16). La ausencia del efecto promotor de crecimiento de *A. brasilense* Cd en colza ya había sido reportada por Diaz Franco y Morales (2006) y Naderifar y Daneshian (2012a y 2012b) y, hasta nuestro conocimiento, no existen, antecedentes que indiquen que la inoculación de esta especie bacteriana promueve el crecimiento de colza. Más aún, son escasos los reportes que describen un incremento en el crecimiento de *Brassica napus* como consecuencia de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno. Singh y Bhargava (1994) inocularon a campo *Azotobacter chroococcum* aplicando simultáneamente fertilizantes nitrogenados. El mayor incremento en el rendimiento de semillas y materia seca total se observó en plantas inoculadas pero no fertilizadas. En discrepancia con estos resultados, Yasari y Patwardhan (2007) a partir de la inoculación con la misma especie bacteriana y con *Azospirillum lipoferum*, demostraron promoción del crecimiento de colza únicamente cuando se aplicaban simultáneamente fertilizantes nitrogenados. En relación a estos resultados, algunos trabajos han informado que sólo una pequeña proporción del total de diazótrofos identificados *in vitro* fijan nitrógeno activamente en asociación con la planta huésped (Bhattacharje y col., 2008).

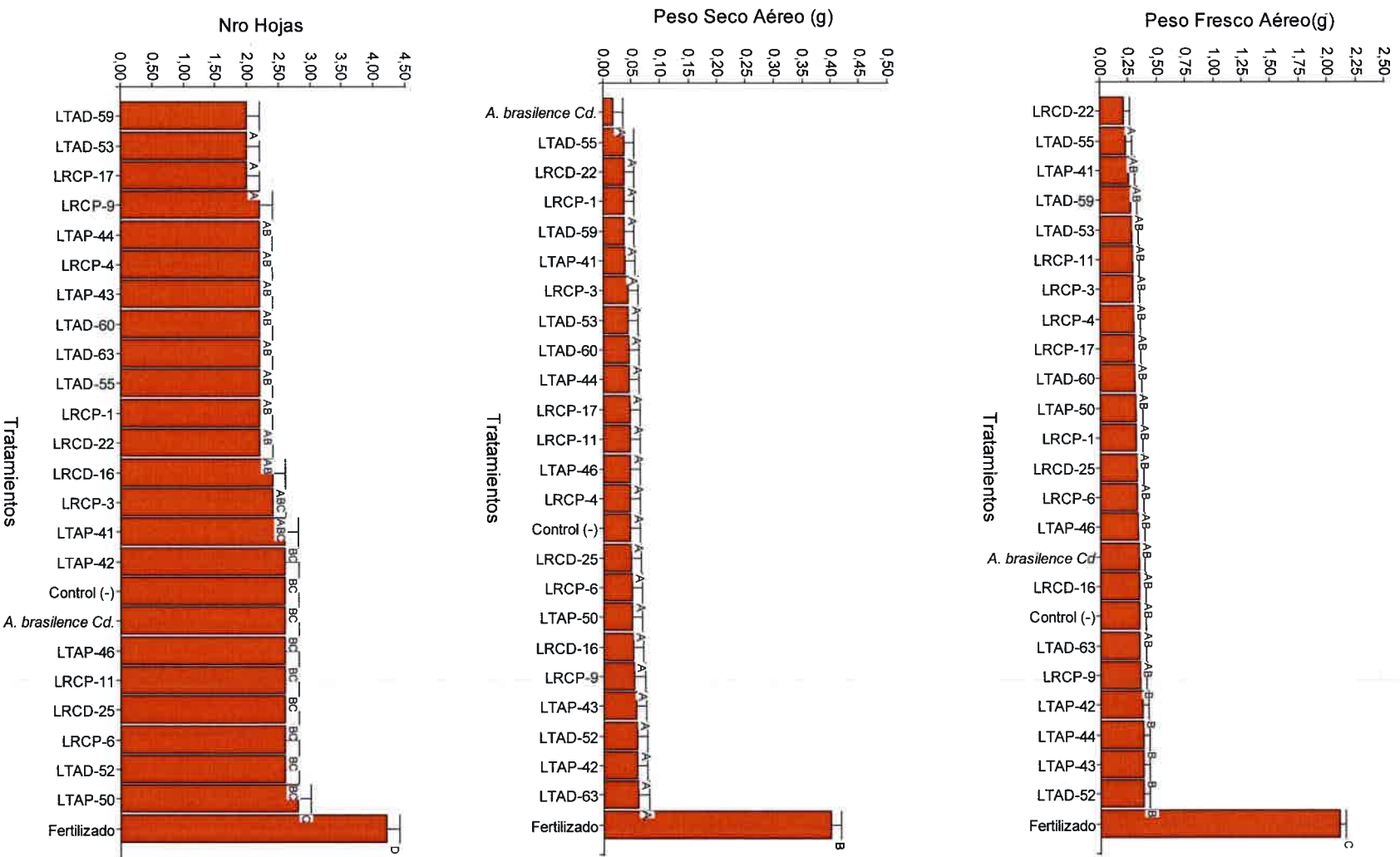


Figura 16. Efecto de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno sobre el peso fresco y seco aéreo y número de hojas de *Brassica napus*. Los datos representan la media \pm E.S de dos réplicas independientes con cinco repeticiones cada una. * indica diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test DMS de Fisher.

Efecto de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno, en combinación con la aplicación de fertilizantes nitrogenados, sobre el crecimiento vegetal

A partir de los antecedentes mencionados, se propuso evaluar el comportamiento de los aislamientos diazotófos seleccionados en este trabajo de tesis, cuando se inoculan en plantas que son fertilizadas con una concentración de nitrógeno reducida al 50%.

La inoculación de los aislamientos LRCD-22, LRCP-11, LTAP-41, LTAD-52 y LRCP-9 incrementó el peso fresco aéreo de las plantas, alcanzando valores similares a los de plantas fertilizadas con N100% (control fertilizado). A excepción de plantas inoculadas con *A. brasilense* Cd, LRCP-3 y LRCP-1 cuyos valores de peso fresco no difirieron del de las plantas fertilizadas con N50% (control negativo), la inoculación con los aislamientos restantes produjo un incremento de dicho parámetro con respecto al control negativo, sin alcanzar el obtenido en plantas fertilizadas con N100%. (Fig 17).

Con respecto al peso seco aéreo, todos los aislamientos evaluados, con excepción de *A. brasilense* Cd, LRCP-1 y LRCP-3, lo incrementaron significativamente en relación a los valores obtenidos a partir de plantas no inoculadas y fertilizadas con N50%. Más aún, el peso seco de las plantas inoculadas con los aislamientos LRCD-25, LRCP-11, LTAP-43, LTAP-41 y LTAP-42 presentó valores significativamente superiores a los provenientes de plantas no inoculadas y fertilizadas con N100%. El mayor incremento en el peso seco aéreo se obtuvo en plantas inoculadas con LTAP-42. Las plantas inoculadas con los restantes aislamientos alcanzaron valores de peso seco aéreo similar al de plantas fertilizadas con N100%. Estos resultados son interesantes ya que estarían indicando que la incorporación de la práctica de inoculación brinda la posibilidad de reducir la cantidad de fertilizante nitrogenado que se adiciona, sin afectar la formación de biomasa (Fig. 17).

Con respecto al número de hojas desarrolladas a las 5 semanas, LTAP-43 fue el único aislamiento que indujo un incremento estadísticamente significativo de este parámetro comparado con plantas fertilizadas con N100% (Fig. 17). No obstante, al momento de la cosecha todas las plantas habían alcanzado el estado de roseta.

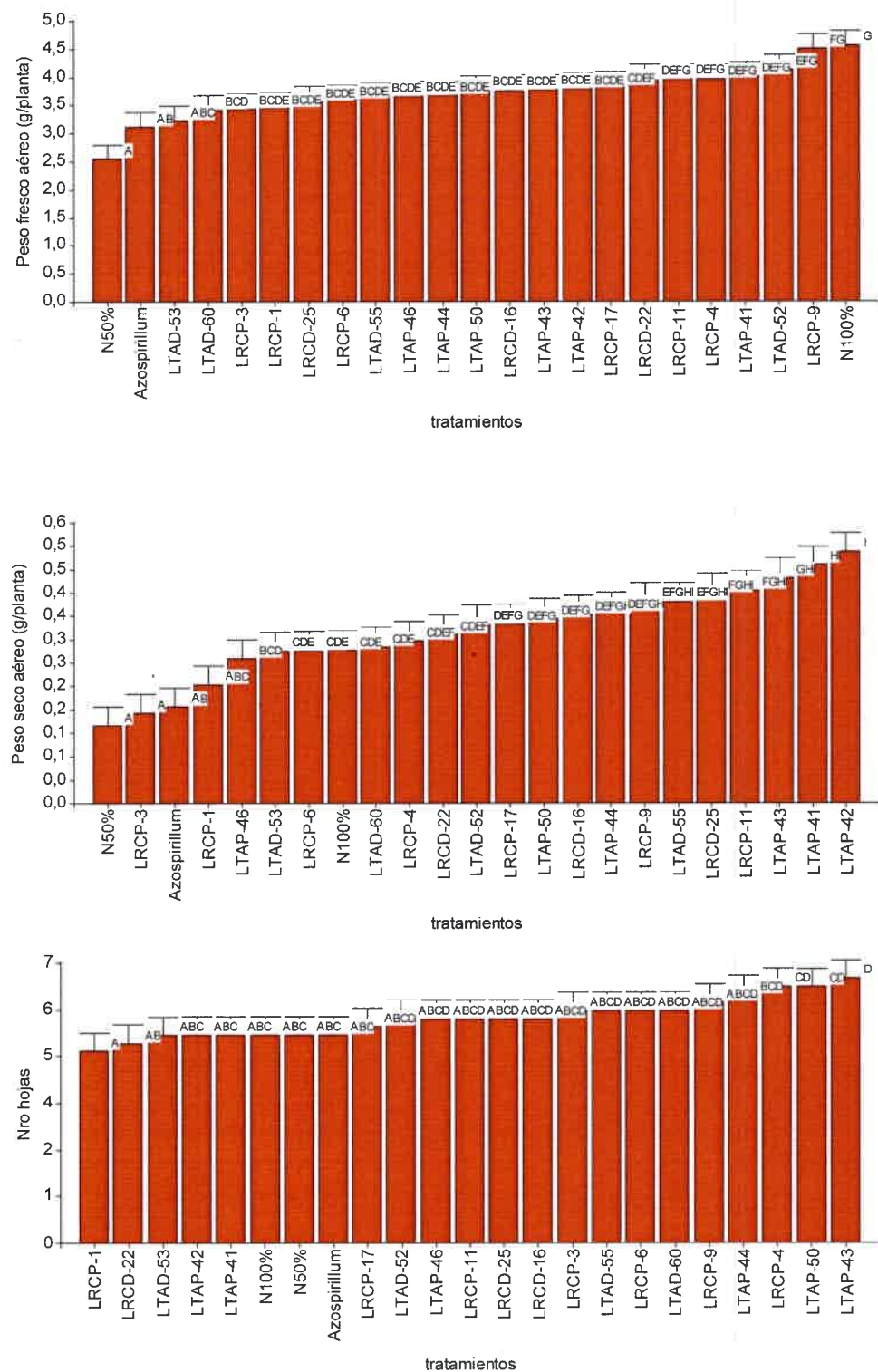


Figura 17. Efecto de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno sobre el peso fresco y seco aéreo, y el número de hojas de *Brassica napus* fertilizadas con el 50% de la dosis de nitrógeno. Los datos representan la media ± E.S de dos réplicas independientes con cinco repeticiones cada una. * indica diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test DMS de Fisher. Control (-): Plantas no inoculadas creciendo con N 50% Fertilizado: Plantas no inoculadas creciendo con N100%

EI-Howeity y Asfour (2012) informaron que en ensayos a campo, la inoculación de semillas de colza con *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum brasilense* y *Paenibacillus polymyxa*, aumentó significativamente el rendimiento cuando se adicionaron al suelo fertilizantes nitrogenados en una dosis reducida al 50%. Por su parte, Nederifar y Deneshian (2012 a y b) concluyeron que es posible aplicar la mitad de la concentración convencional de nitrógeno simultáneamente con la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno sin afectar el rendimiento de canola.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en estos ensayos, se seleccionaron las cepas fijadoras de nitrógeno LTAD-52, LTAP-43, LTAP-42, LTAP-41, LRCP-4 y LRCP-11 para secuenciar el gen *16S rARN* y determinar el género al cual pertenecen mediante una técnica molecular.

Caracterización genotípica

Previo a la identificación genética de los aislamientos estudiados, y con el objetivo de confirmar que cada uno de ellos representa una cepa diferente, se determinó su perfil ERIC-PCR. Los perfiles obtenidos a partir de los 40 aislamientos analizados difirieron entre ellos, indicando por lo tanto que se trataría de cepas diferentes (Fig. 18).



Figura 18. Perfil ERIC-PCR de aislamientos de la rizósfera de colza. 1: Marcador 100pb, **2:** LTAD-59 **3:** LRCP-7, **4:** LRCP-10, **5:** LTAD-52, **6:** LRCP-11, **7:** LRCP-1, **8:** LRCP-2, **9:** LRCP-3, **10:** Marcador 100pb, **11:** LRCP-4, **12:** LTAP-48, **13:** LTAP-50, **14:** LTAD-53, **15:** LTAD-55, **16:** LTAD-60, **17:** LTAD-63, **18:** LRCP-9, **19:** LRCP-14, **20:** LRCP-17, **21:** LTAP-41, **22:** LTAP-42, **23:** LTAP-44, **24:** LTAP-61.

Los aislamientos solubilizadores de fosfato y fijadores de nitrógeno cuya inoculación incrementó el crecimiento de plantas de colza, así como aquéllos que, por sus características fenotípicas, se ubicarían en géneros nunca antes descritos en asociación con la planta de colza (*Serratia*, *Aeromonas* y *Lactobacillus*) fueron identificados genéticamente mediante la secuenciación de aproximadamente 1500 pb del gen 16S rARN.

Los resultados obtenidos (Tabla 8) permiten ubicar a los aislamientos analizados dentro de los Phyla *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacteria*. Sólo 3 de ellos (LRCP-2, LRCP-3 y LRCP-4) mostraron pertenecer al mismo género que había sido determinado a partir de sus características fenotípicas. Mediante esta técnica se pudo identificar el aislamiento LRCP-11, lo que no había sido posible utilizando pruebas bioquímicas. Ello corrobora que las técnicas moleculares permiten una mayor discriminación de taxones que las bioquímicas y/o morfológicas. A ello se suma el hecho de que se dispone en la base de datos genéticos de secuencias de genes de especies para las cuales no se ha descrito aún la batería bioquímica requerida para su caracterización fenotípica.

Considerando la información obtenida a partir de la caracterización genotípica de los aislamientos, en este trabajo se describen por primera vez asociados a la rizósfera de colza los géneros *Serratia*, *Stenotrophomonas*, y *Microbacterium*. Por el contrario, los géneros *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Pantoea* y *Arthrobacter* han sido previamente aislados de la rizósfera de dicha planta (de Freitas y col., 1997; Germida y col., 1998; Siciliano y Germida, 1999; Croes y col., 2015).

Los aislamientos solubilizadores de fósforo cuya inoculación incrementó el crecimiento de colza pertenecían a los géneros *Arthrobacter* sp. (LRCP-11), *Serratia* sp. (LRCP-29), *Bacillus* sp. (LRCP-2, LRCP-3, LRCP-4, LTAD-52) y *Pantoea* sp. (LRCP-17). Si bien la capacidad de solubilizar fósforo de estos géneros ya fue descrita anteriormente (Arora y Gaur, 1979; Kloepper, 1989; Son y col. 2006), en este trabajo se demuestra por primera vez que la inoculación de bacterias solubilizadoras de fosfato de los géneros *Bacillus* y *Pantoea* promueve el crecimiento de colza.

Los aislamientos fijadores de nitrógeno que incrementaron el crecimiento de colza pertenecían a los géneros *Bacillus* sp. (LTAD-52, LTAP-42, LTAP-43, LRCP-2) y *Arthrobacter* sp. (LRCP-11, LTAP-41). Si bien se han identificado bacterias de dichos géneros capaces de fijar nitrógeno, no existen reportes que demuestren su actividad promotora del crecimiento de colza.

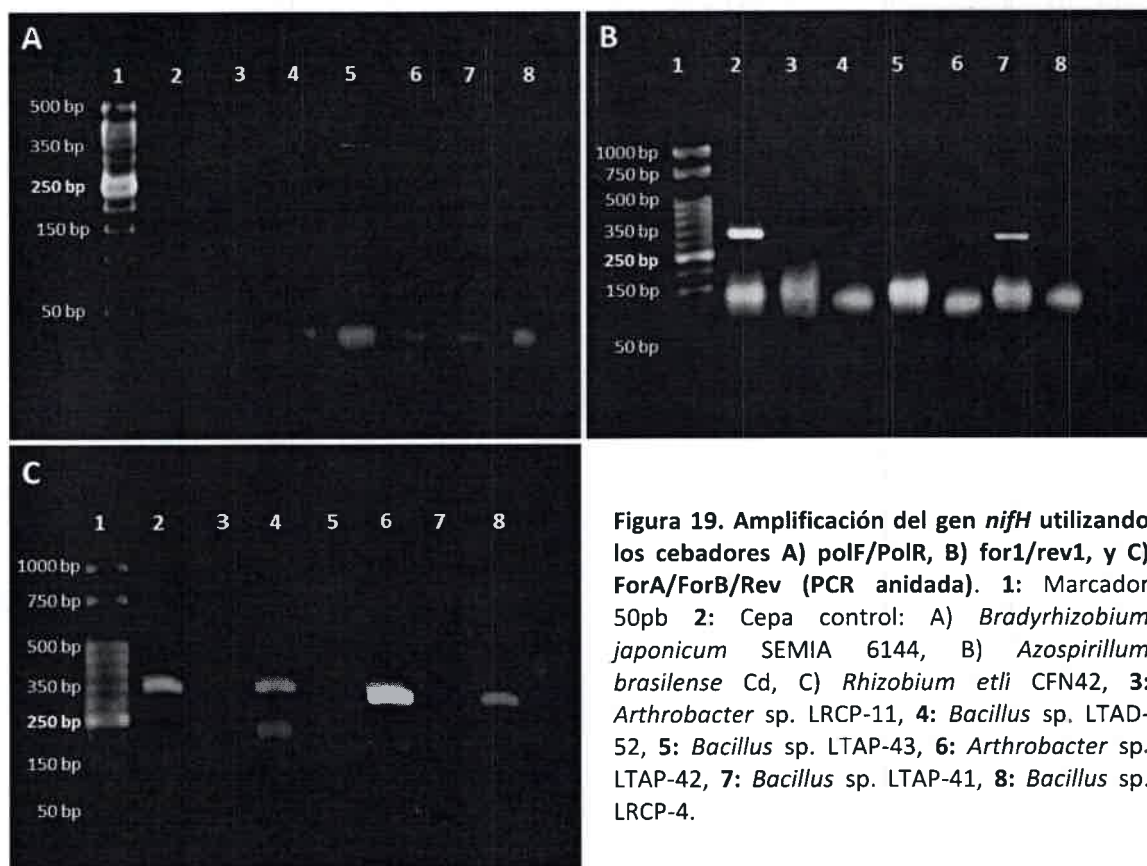


Tabla 8. Identificación taxonómica de los aislamientos en base a la secuencia de aproximadamente 1500 pb del gen *16S ARNr*.

<i>Aislamiento</i>	<i>Secuencia con mayor identidad (GenBank)</i>	<i>Identidad (%)</i>	<i>Secuencia Cubierta (%)</i>	<i>Grupo Bacteriano</i>
LRCD-16	<i>Stenotrophomonas</i> sp. cepa BBTR57 (DQ337605.1)	99	99	Proteobacteria
LTAP-49	<i>Bacillus simplex</i> strain IHB B 7066 (KJ721216.1)	99	97	Actinobacteria
LTAP-44	<i>Bacillus subtilis</i> cepa AJ080718IA-25 (HQ727971.1)	100	99	Firmicutes
LTAD-61	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i> cepa 3084 (EU714352.1)	96	99	Actinobacteria
LRCP-11	<i>Arthrobacter</i> sp. cepa PO-08 (AB259962.1)	99	100	Actinobacteria
LRCP-17	<i>Pantoea agglomerans</i> cepa ChDC YP1 (AY691543.1)	99	99	Proteobacteria
LRCP-29	<i>Serratia nematodiphila</i> cepa P36 (FJ662869.1)	99	99	Proteobacteria
LRCP-3	<i>Bacillus safensis</i> cepa BN-2 (AB971370.1)	99	100	Firmicutes
LRCP-4	<i>Bacillus</i> sp. cepa RKAT-07 (LN849695.1)	99	100	Firmicutes
LRCP-2	<i>Bacillus megaterium</i> cepa KNUC9061 (JF505995.1)	99	100	Firmicutes
LRCP-41	<i>Arthrobacter</i> sp. cepa TM5_1 (DQ279377.1)	99	100	Actinobacteria
LRCP-43	<i>Bacillus</i> sp. cepa AEPR21 (JN817497.1)	98	98	Firmicutes
LTAD-52	<i>Bacillus pumilus</i> cepa MUST-3 (KF727586.1)	99	100	Firmicutes
LRCP-42	<i>Bacillus</i> sp. cepa CGS15 (KF886285.1)	99	99	Firmicutes

Detección de genes bacterianos asociados a la fijación biológica de nitrógeno

Se evaluó la presencia de los genes *nifH* y *nifD* para confirmar el carácter diazótrofo de los aislamientos fijadores de nitrógeno seleccionados desarrollando diferentes estrategias metodológicas. En ningún caso fue posible amplificar el gen *nifD*. Sin embargo, en todos los aislamientos se obtuvo el producto de amplificación esperado del gen *nifH* (de aproximadamente 360 pb utilizando los cebadores polF/PolR, de 363 pb con for1/rev1, y de 371 pb con ForA/ForB/Rev en la PCR anidada), con excepción de *Arthrobacter* sp. LRCP-11 (Fig. 19). Si bien se ha reportado la capacidad de fijar nitrógeno de *Bacillus*, no se han depositado secuencias del gen *nifD* pertenecientes a éste género ni tampoco del gen *nifD* y *nifH* del género *Arthrobacter* en la base de datos genéticos.



La imposibilidad de detectar la presencia de genes *nif* en bacterias diazótrofes ha sido reportada en otros estudios. Stolfus y col. (1997) informaron que cepas bacterianas cuya capacidad de fijar nitrógeno había sido confirmada mediante la técnica de reducción de acetileno, no mostraron señal de hibridación cuando se utilizó una sonda del gen *nifD*. Estos autores sugieren que en dichas bacterias las secuencias de los genes *nifD* podrían ser muy divergentes, o bien podrían contener sistemas *nif* alternativos (Liba y col 2006). Ventura y col. (2007) reportaron que cepas de *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Streptomyces* y *Arthrobacter* no poseen genes homólogos al *nifH* aun siendo capaces de reducir acetileno. Bürgmann y col. (2004) emplearon cebadores universales y otros diseñados para diferentes grupos de diazotrofos, con el fin de amplificar el gen *nifH* en seis cepas de referencia ubicadas en distintos géneros. Con los cebadores universales no fue posible obtener producto de amplificación en 3 de estas cepas, lo cual corrobora que, en algunas bacterias diazotroficas, no es posible amplificar dicho gen.

Capacidad de colonizar raíces de colza de bacterias solubilizadoras de fosfato

Una condición necesaria para que una rizobacteria sea considerada una verdadera PGPR es la colonización del sistema radical de la planta con la que se establece la asociación (Chen y col., 1992; Chen y Gu, 1993; Liu y Sinclair, 1993; Forlani y col., 1995; Liu y col., 1995; Kloepper y col., 1997; Dekkers y col., 1998). La colonización radical implica la migración hacia las raíces, la adsorción y el anclaje, como así también la proliferación microbiana y la formación de biofilm en la superficie de dicho órgano (Reinholdt y col., 1986; Zhu y col., 2002; Alexandre y Zhulin, 2007; Vanbleu y Vanderleyden, 2007; Compant y col., 2010; Reinholdt-Hurek y Hurek, 2011).

En condiciones de laboratorio, los diferentes mecanismos por los cuales las rizobacterias promueven el crecimiento vegetal han demostrado jugar un rol importante en la estimulación de la germinación, en el desarrollo de las raíces y/o en la producción de biomasa en diferentes cultivos. Sin embargo, en ensayos a campo se han observado resultados inconsistentes. Esto se ha atribuido en gran parte a la incapacidad de algunas PGPRs de alcanzar densidades celulares adecuadas en la rizósfera cuando se encuentran en condiciones ambientales frecuentemente variables y de alta presión competitiva (English y col., 2010).

La capacidad de colonizar las raíces de colza se determinó en los 7 aislamientos solubilizadores de fosfato que incrementaron el peso seco aéreo de plantas de colza en ensayos realizados previamente en cámara de cultivo de plantas (*Bacillus* sp. LTAD-52, *Bacillus* sp. LRCP-2, *Bacillus* sp. LRCP-3, *Bacillus* sp. LRCP-4, *Arthrobacter* sp. LRCP-11, *Pantoea* sp. LRCP-17 y *Serratia* sp. LRCP-29). *Bacillus* sp. LRCP-4 fue el aislamiento que mostró mayor capacidad de colonización ($3,59 \times 10^7$ UFC/g de raíz) observándose diferencias significativas con *Bacillus* sp. LRCP-3, ($2,58 \times 10^6$ UFC/g de raíz), *Arthrobacter* sp. LRCP-11 ($4,26 \times 10^6$ UFC/g de raíz) y *Serratia* sp. LRCP-29 ($5,79 \times 10^6$ UFC/g de raíz). El número de células viables determinado en las raíces inoculadas con los aislamientos *Bacillus* sp. LTAD-52 ($1,81 \times 10^7$ UFC/g de raíz), *Bacillus* sp. LRCP-2 ($1,18 \times 10^7$ UFC/g de raíz) y *Pantoea* sp. LRCP-17 ($2,12 \times 10^7$ UFC/g de raíz) no presentó diferencias significativas con ninguno de los aislamientos evaluados (Fig. 20).

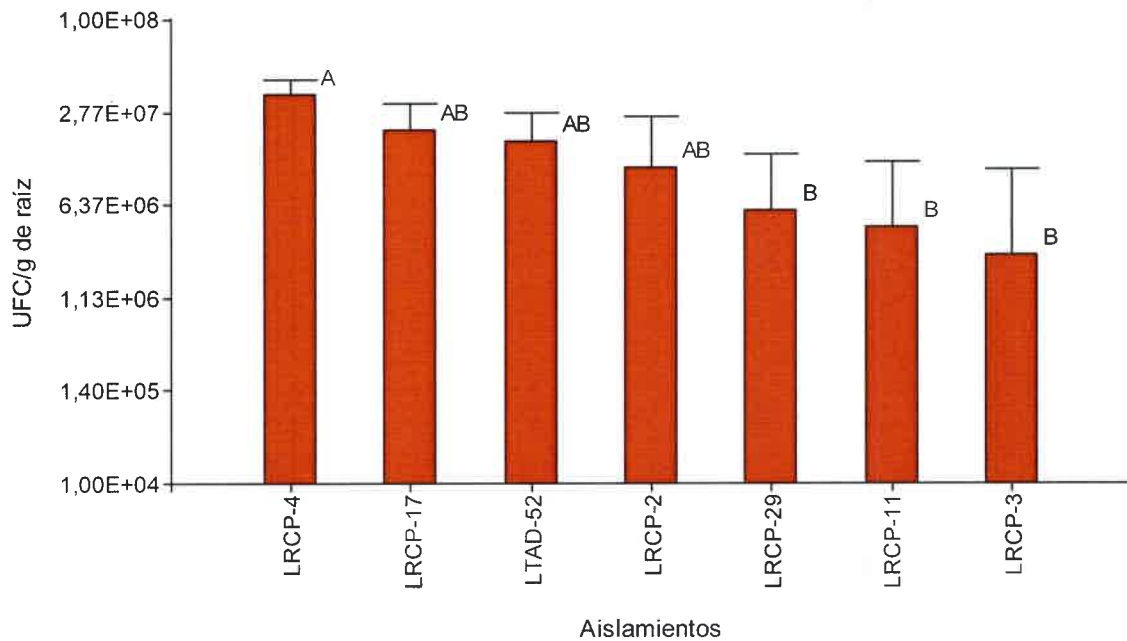


Figura 20. Colonización radical de los aislamientos solubilizadores de fósforo en plantas de colza. Los datos representan la media \pm E.S de dos replicas independientes con tres repeticiones cada una. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test DMS de Fisher.

La mayor capacidad de *Bacillus* sp. LRCP-4 para colonizar las raíces podría significar una ventaja competitiva. No obstante, es importante considerar que en el ensayo realizado para determinar dicha capacidad, este aislamiento se encontraba en ausencia de presión de competitividad. En condiciones a campo, la colonización efectiva de la raíz podría contribuir al establecimiento y a la proliferación bacteriana en la rizósfera, siendo éste un punto clave para competir con otros organismos y promover el crecimiento vegetal (Dennis y col. 2010).

Influencia de los exudados radicales sobre el crecimiento y la supervivencia de bacterias solubilizadoras de fosfato

Está bien descrito que los exudados radicales contienen compuestos que pueden modificar la estructura y composición de la comunidad microbiana de la rizósfera debido, entre otras cosas, a su uso preferencial como sustrato por diferentes especies microbianas (Somers y col., 2004; Hartmann y col., 2009). También se ha demostrado que componentes de los exudados radicales tales como carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos, estimulan la respuesta quimiotáctica de las bacterias (Somers y col., 2004). Sin embargo, algunos exudados afectan negativamente la colonización bacteriana (Bais y col., 2006), mientras que en otros casos y debido a que las bacterias son resistentes a los agentes antimicrobianos presentes en los exudados, la colonización radical no es modificada (Rumberger y Marschner, 2004).

El efecto de los exudados radicales sobre la supervivencia y el crecimiento bacteriano se determinó en los aislamientos solubilizadores de fosfato que mostraron incrementar el peso seco aéreo de plantas de colza (*Bacillus* sp. LTAD-52, LRCP-2, LRCP-3, LRCP-4, *Arthrobacter* sp. LRCP-11, *Pantoea* sp. LRCP-17 y *Serratia* sp. LRCP-29). Además, se evaluó también dicho efecto en aislamientos obtenidos de maní (*Serratia* sp. S119 y *Pantoea* sp. J49) que, a diferencia de lo observado en colza, incrementaron el crecimiento de dicha leguminosa (Taurian y col., 2010). Se determinó que, como era esperable debido a la concentración de nutrientes disponible, todos los aislamientos alcanzaron una mayor densidad celular cuando crecieron en medio TSB_r 50%, en comparación con el medio TSB_r 10% (Fig. 21a y 21b). El agregado de exudados radicales no modificó el crecimiento de ninguno de los aislamientos, excepto el de *Serratia* sp. LRCP-29, el cual resultó leve pero significativamente estimulado, luego de 12 hs de incubación en el medio TSB_r 10% (Fig. 21b).

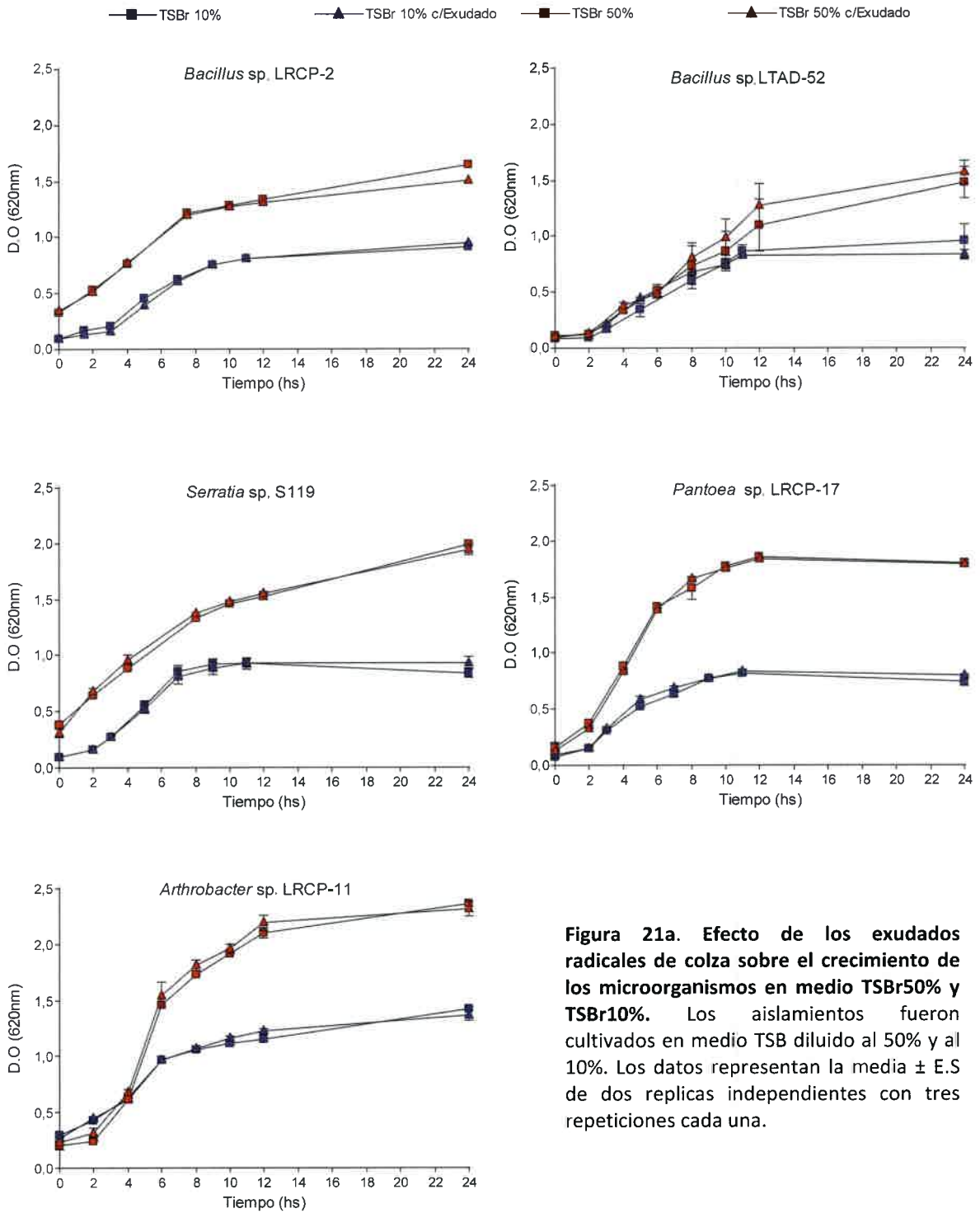


Figura 21a. Efecto de los exudados radicales de colza sobre el crecimiento de los microorganismos en medio TSB50% y TSB10%. Los aislamientos fueron cultivados en medio TSB diluido al 50% y al 10%. Los datos representan la media \pm E.S de dos replicas independientes con tres repeticiones cada una.



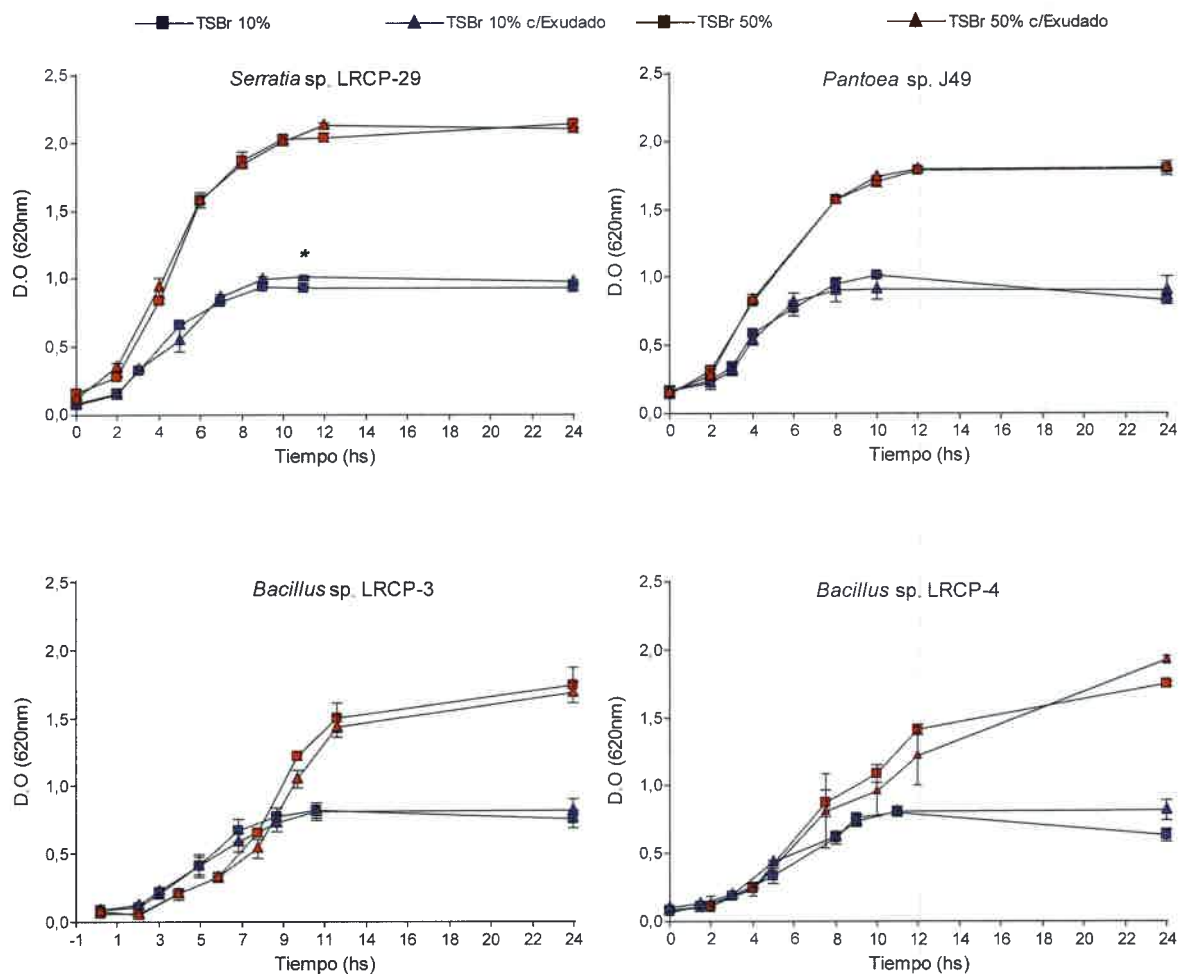


Figura 21b. Efecto de los exudados radicales de colza sobre el crecimiento de los microorganismos en medio TSBr 50% y TSBr 10%. Los aislamientos fueron crecidos en medio de cultivo TSB diluido al 50% y 10%. Los datos representan la media \pm E.S. de dos replicas independientes con tres repeticiones cada una. * indica diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test DMS de Fisher.

La evaluación del efecto de los exudados radicales de colza sobre la supervivencia bacteriana indicó que el N° de células viables de los aislamientos analizados no se modificó por la presencia de dichos exudados en el medio de cultivo TSBr 50% o TSBr 10% (Tabla 9). Si bien el crecimiento de *Serratia* sp. LRCP-29 se incrementó levemente en el medio TSBr 10% en presencia de exudados radicales (Fig. 21b), dicho incremento en la D.O. del cultivo no se reflejó en el recuento de microorganismos viables a las 24 hs de cultivo (Tabla 9). Es, por lo tanto, posible

sugerir que los exudados de colza no contienen en su composición compuestos que puedan afectar negativamente o estimular el crecimiento y la viabilidad de los aislamientos cuando crecen en bajas concentraciones de nutrientes. Estas condiciones fueron elegidas ya que se asemejarían a las existentes en el suelo, considerando que la disponibilidad de nutrientes en este ambiente natural está notablemente reducida en comparación con la existente en medios de cultivo bacteriano. Otra alternativa hubiera sido el uso de medios mínimos, pero ello no fue posible debido a la incapacidad de algunos aislamientos de desarrollar en esas condiciones.

Tabla 9. Efecto de los exudados radicales de colza sobre la sobrevivencia bacteriana creciendo en medio TSB_r50% y TSB_r10%.

Aislamiento	Sobrevivencia (UFC/ml) *			
	TSBr50%		TSBr10%	
	Sin exudados	Con exudados	Sin exudados	Con exudados
<i>Bacillus</i> sp. LTAD-52	4,50E ⁸ ±1,84 a	7,32E ⁸ ±1,84 a	1,14E ⁷ ±0,20 a	1,14E ⁷ ±0,17 a
<i>Bacillus</i> sp. LRCP-2	2,26E ⁶ ±0,98 a	2,27E ⁶ ±0,98 a	6,44E ⁴ ±0,29 a	6,88E ⁴ ±0,29 a
<i>Bacillus</i> sp. LRCP-3	2,59E ⁸ ±1,21 a	6,12E ⁸ ±1,21 a	8,64E ⁵ ±2,99 a	6,98E ⁶ ±0,68 a
<i>Bacillus</i> sp. LRCP-4	1,31E ⁸ ±1,80 a	1,42E ⁸ ±0,39 a	9,80E ⁶ ±1,80 a	2,96E ⁶ ±0,63 a
<i>Arthrobacter</i> sp. LRCP-11	1,88E ⁹ ±1,56 a	1,39E ⁹ ±0,11 a	3,76E ⁷ ±1,56 a	2,31E ⁷ ±0,11 a
<i>Pantoea</i> sp. LRCP-17	1,15E ⁹ ±0,41 a	1,58E ⁹ ±0,41 a	3,14E ⁷ ±0,44 a	3,66E ⁷ ±0,50 a
<i>Serratia</i> sp. LRCP-29	1,94E ⁹ ±0,11 a	1,64E ⁹ ±0,11 a	5,77E ⁷ ±0,96 a	8,44E ⁷ ±1,05 a
<i>Serratia</i> sp. S119	3,23E ⁹ ±0,48 a	2,13 ⁹ ±0,53 a	0,91E ⁸ ±0,19 a	1,40E ⁸ ±0,40 a
<i>Pantoea</i> sp. J49	2,06E ⁹ ±0,73 a	2,86 ⁹ ±0,73 a	2,99E ⁷ ±0,38 a	3,33E ⁷ ±0,66 a

* Los datos representan la media ± E.S de tres replicas independientes con tres repeticiones cada una. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05) según el test DMS de Fisher cuando se compara a cada aislamiento creciendo en el mismo medio de cultivo con o sin exudados.

Formación de biofilm y efecto de los exudados radicales sobre dicha capacidad en bacterias solubilizadoras de fosfato

Las raíces de las plantas exudan compuestos que pueden interferir con las señales de *quórum sensing* y estimular o inhibir distintos procesos bacterianos (Bais y col., 2006; Tepliski y col., 2000). Uno de estos procesos es la formación de biofilm, el cual está asociado a la colonización radical (Bais y col., 2004; de Weert y col., 2002) y constituye una estrategia de supervivencia bacteriana en ambientes diversos (Ramey y col., 2004; Webb y col., 2003).

La capacidad de formar biofilm de los aislamientos evaluados difirió según el medio de cultivo en el cual fue llevado a cabo el experimento. En TSB_r 50%, *Bacillus* sp. LTAD-52 mostró el mayor índice de formación de biofilm, mientras que *Serratia* sp. LRCP-29 y *Bacillus* sp. LRCP-2 presentaron los valores más bajos (aproximadamente 16 veces menor). En cambio, en el medio de cultivo TSB_r 10%, *Bacillus* sp. LRCP-3 mostró el mayor índice y, al igual que lo observado en TSB_r 50%, *Serratia* sp. LRCP-29 mostró la menor capacidad de formar biofilm. Si se comparan los resultados obtenidos en ambos medios de cultivo, se puede concluir que la disminución de la concentración de nutrientes en ausencia de exudados aumentó significativamente la formación de biofilm de los aislamientos *Bacillus* sp. LRCP-3, *Pantoea* sp. J-49, *Bacillus* sp. LRCP-2 (Tabla 10).

Es interesante que se hayan observado marcadas diferencias en la capacidad de formar biofilm entre los diferentes aislamientos evaluados tanto en TSB_r 50% como en TSB_r 10%. Esto indicaría que la respuesta de la población bacteriana frente a una situación adversa como la baja disponibilidad de nutrientes podría ser diversa. Una mayor capacidad de formar biofilm, le confiere al microorganismo una ventaja para establecerse en un ambiente determinado, colonizar la rizósfera y competir con otros microorganismos (Hamon y Lazazzera, 2001; Molina y col., 2003; Danhorn y Fuqua, 2007). Por lo tanto, esta característica podría ser relevante a la hora de seleccionar un aislamiento para evaluar en ensayos a campo su capacidad de promover el crecimiento vegetal.

Los resultados obtenidos de la evaluación del efecto de los exudados sobre la capacidad de formar biofilm de las bacterias creciendo en el medio TSB_r 50% se muestran en la figura 22. El índice de formación de biofilm de *Pantoea* sp. J49, *Bacillus* sp. LRCP-2, *Serratia* sp. S119, *Bacillus* sp. LTAD-52, *Pantoea* sp. LRCP-17 y *Serratia* sp. LRCP-29 no se vió afectado por la presencia de exudados radicales de

colza, mientras que el de *Bacillus* sp. LRCP-3 se incrementó y el de *Bacillus* sp. LRCP-4 y de *Arthrobacter* sp. LRCP-11 disminuyó.

Tabla 10. Capacidad de formar biofilm de los aislamientos.

Aislamiento	Índice de formación de biofilm	
	TSBr 50%	TSBr 10%
<i>Bacillus</i> sp. LRCP-3	0,84 ± 0,22 f *	21,36 ± 1,59 a
<i>Bacillus</i> sp. LRCP-2	0,38 ± 0,08 f *	9,25 ± 0,30 b
<i>Bacillus</i> sp. LTAD-52	9,12 ± 0,70 a	8,74 ± 0,79 b
<i>Pantoea</i> sp. J-49	3,36 ± 0,09 c *	6,25 ± 0,37 c
<i>Bacillus</i> sp. LRCP-4	4,74 ± 0,11 b	5,41 ± 0,38 c
<i>Arthrobacter</i> sp. LRCP-11	3,16 ± 0,14 c d	3,50 ± 0,29 d
<i>Pantoea</i> sp. LRCP-17	2,83 ± 0,12 d	2,87 ± 0,23 d e
<i>Serratia</i> sp. S119	1,56 ± 0,08 e	1,59 ± 0,03 e f
<i>Serratia</i> sp. LRCP-29	0,60 ± 0,05 f	0,53 ± 0,09 f

Los datos representan la media ± E.S de tres replicas independientes con siete repeticiones cada una. Letras distintas indican diferencias significativas para cada columna ($p < 0,05$) según el test DMS de Fisher. * indica diferencias significativas para valores de la misma fila ($p < 0,05$) según el test DMS de Fisher.

Cuando en el medio TSBr 10% están presentes los exudados radicales, se observa que éstos promueven significativamente la formación de biofilm de *Pantoea* sp. J49, *Bacillus* sp. LRCP-2, *Serratia* sp. S119, *Pantoea* sp. LRCP-17 y *Serratia* sp. LRCP-29. Por el contrario, *Arthrobacter* sp. LRCP-11 mostró una marcada disminución del índice de formación de biofilm cuando creció en presencia de exudados radicales, siendo este comportamiento idéntico al observado en medio TSBr 50%. Los aislamientos *Bacillus* sp. LRCP-3, *Bacillus* sp. LRCP-4 y *Bacillus* sp. LTAD-52, no mostraron cambios significativos en presencia de dichos exudados creciendo en el medio TSBr10% (Fig. 23).

El efecto sobre la capacidad de formar biofilm producido por la presencia de exudados radicales difirió según la concentración de nutrientes del medio de cultivo utilizado. Sólo los aislamientos *Arthrobacter* sp. LRCP-11 y *Bacillus* sp. LTAD-52 mostraron idéntico comportamiento tanto en el medio TSBr 50% como TSBr 10%.

En general, se concluye que la capacidad de formar biofilm de los aislamientos evaluados puede ser estimulada, inhibida o no alterarse por los exudados radicales de colza. Por otra parte, una menor concentración de nutrientes en el medio (TSBr 10%) parece afectar la formación de biofilm de la mayoría de los aislamientos.

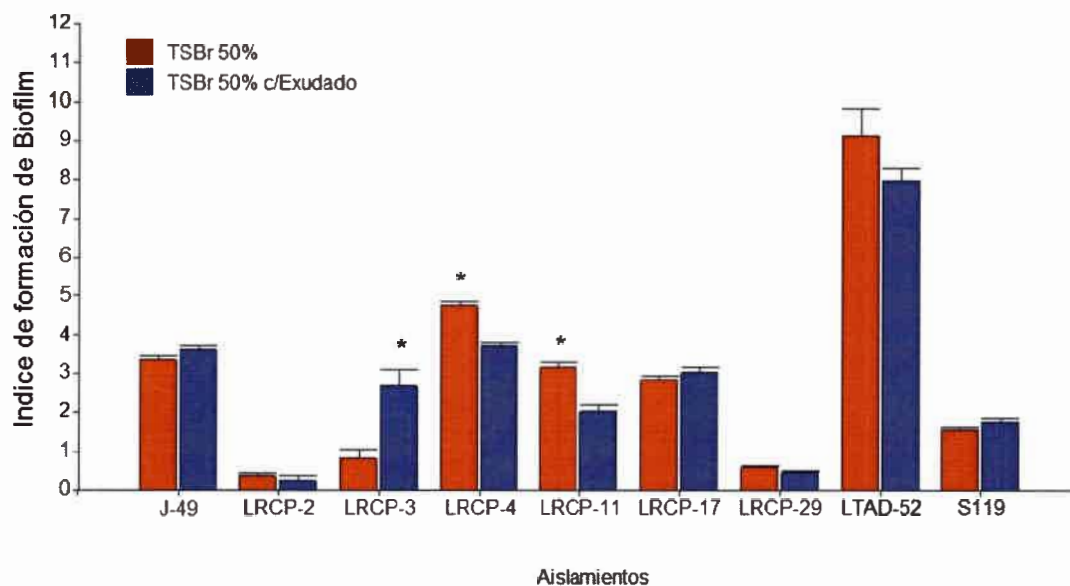


Figura 22. Efecto de los exudados radicales de colza sobre la formación de biofilm de los aislamientos creciendo en medio TSB50%. Los datos representan la media \pm E.S de tres replicas independientes con siete repeticiones cada una. * indica diferencias significativas para cada aislamiento ($p < 0,05$) según el test DMS de Fisher.

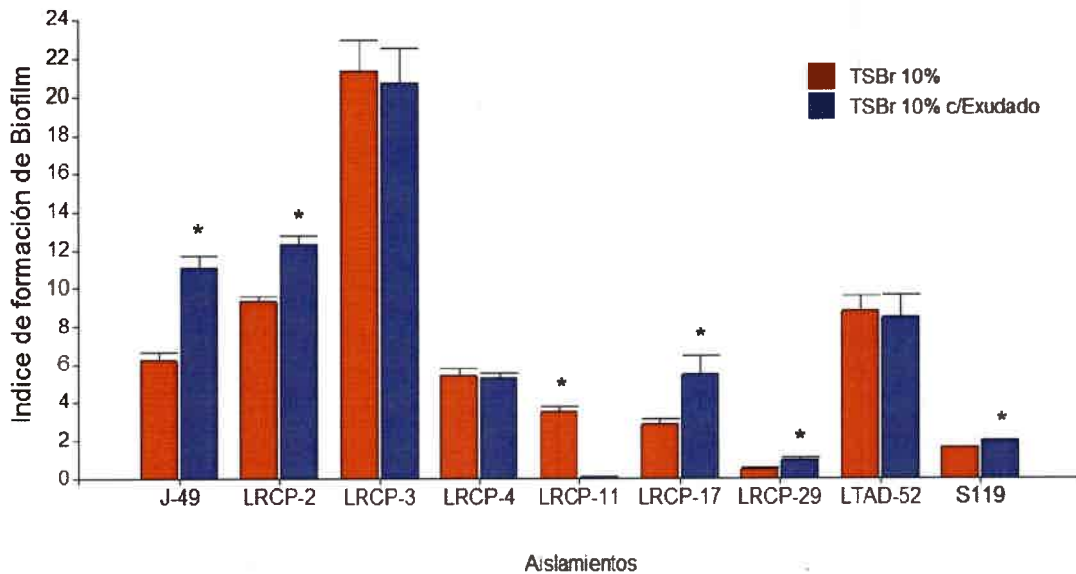


Figura 23. Efecto de los exudados radicales de colza sobre la formación de biofilm de los aislamientos creciendo en TSB10%. Los datos representan la media \pm E.S de tres replicas independientes con siete repeticiones cada una. * indica diferencias significativas para cada aislamiento ($p < 0,05$) según el test DMS de Fisher.

Se ha reportado que los exudados de arroz y poroto estimulan la formación de biofilm de *S. fredii* SMH12 y, como consecuencia, la colonización de la raíz. Los autores proponen que estas plantas podrían percibir a dicha bacteria como un microorganismo beneficioso. En cambio, los exudados radicales de arroz no modificaron la formación de biofilm de *Pantoea ananatis* AMG501, pero en poroto, compuestos exudados por las semillas que mimetizan la acción de AHL, disminuyeron dicha capacidad, por lo que los autores proponen que *Pantoea ananatis* AMG501 es percibido como perjudicial por esta leguminosa (Perez Montaña y col., 2013).

Tan y col. (2013) informaron que los ácidos orgánicos identificados en los exudados radicales de tomate no afectan la formación de biofilm de *Bacillus amyloliquefaciens* T-5. Sin embargo, cuando se evaluó dicha capacidad utilizando cultivos en medio LB diluido al 10% suplementados con exudados radicales, el valor del índice de formación de biofilm fue mayor comparado con el obtenido a partir de cultivos en medio LB sin diluir, con o sin la adición de exudados. Resultados similares fueron obtenidos en este trabajo de tesis, los que estarían confirmando que la formación de biofilm se encuentra estimulada en condiciones de baja concentración de nutrientes.

Las diferencias observadas en la capacidad de los microorganismos de formar biofilm en presencia de exudados de colza, podría deberse a compuestos que interfieren con la producción de señales de *quórum sensing*, como ya ha sido descrito para otros procesos microbianos (Bais y col., 2006; Teplitski y col., 2000; Perez Montaña y col., 2013). Para confirmar dicha hipótesis se evaluó la producción de señales de *quórum sensing* de dichos aislamientos en presencia de exudados.

Influencia de los exudados radicales de colza sobre las señales de quórum sensing de bacterias solubilizadoras de fosfato

Con el objetivo de determinar si la presencia de exudados de colza afecta las señales de *quórum sensing*, se determinó la producción de autoinductores de los aislamientos crecidos en el medio TSB_r10%, en presencia y ausencia de exudados radicales. Como controles positivos se utilizaron las cepas *P. aeruginosa* PAOI y *S. fredii* HH103, que producen AHL de cadena corta (C₄-C₆) y de cadena larga (C₁₀-C₁₈), respectivamente. Debido a que las bacterias Gram positivas no producen AHL como molécula *quórum*, se evaluaron solo las Gram negativas aisladas de colza (*Pantoea* sp. LRCP-17, *Serratia* sp. LRCP-29), y las provenientes de maní (*Serratia* sp. S119 y *Pantoea* sp. J49).

En el ensayo realizado empleando el biosensor *C. violaceum* CV026 no fue posible observar producción de AHL en ninguno de los aislamientos evaluados a excepción del control positivo (Fig. 24). Por lo tanto se infiere que no producirían niveles detectables de AHL de cadena corta (C₄-C₈). McClean y col. (1997) informaron que bacterias que producen AHL con cadenas laterales de N-acilo de 10 a 14 C de longitud fueron incapaces de inducir la producción de violaceína en *C. violaceum* CV026. Más aún, si dichas moléculas de AHL eran incorporadas al medio en el que se realizaba el ensayo, se inhibía la producción de violaceína.



Figura 24. Detección de AHL mediante la cepa biosensora *C. violaceum* CV026. A modo de ejemplo se muestran los resultados obtenidos sólo para el aislamiento *Serratia* sp. LRCP-29, además de los correspondientes a los controles positivo y negativo

En el ensayo realizado empleando la cepa reportera *A. tumefaciens* NT1-pZLR4 se detectó la producción de AHLs en todos los aislamientos evaluados. El diámetro del halo producido disminuyó cuando crecieron en presencia de exudados, con excepción de *Pantoea* sp. LRCP-17 cuyo halo no se vio modificado. En los aislamientos *Pantoea* sp. J-49 y *Serratia* sp. S-119 el diámetro disminuyó significativamente en presencia de exudados, mientras que *Serratia* sp. LRCP-29 no produjo AHLs detectables en estas condiciones, a juzgar por la ausencia del halo esperado (Fig. 25).

Las plantas producen moléculas con propiedades químicas similares a las AHLs, afectando por lo tanto distintos procesos regulados por el mecanismo de *quórum sensing* (Bais y col., 2006; Teplitski y col. 2000). Las AHLs producidas por *S. meliloti* y *P. aeruginosa* inducen cambios en la síntesis de 150 proteínas de la leguminosa *Medicago truncatula*. Entre las proteínas reguladas por dichas AHLs se encuentran factores que inhiben a la molécula señal AI-2, requerida para el funcionamiento del sistema de *quórum sensing* interespecie (relacionado con la patogenicidad), estimulando de este modo la señalización por AHL intraespecífica en bacterias benéficas (Mathesius y col., 2003).

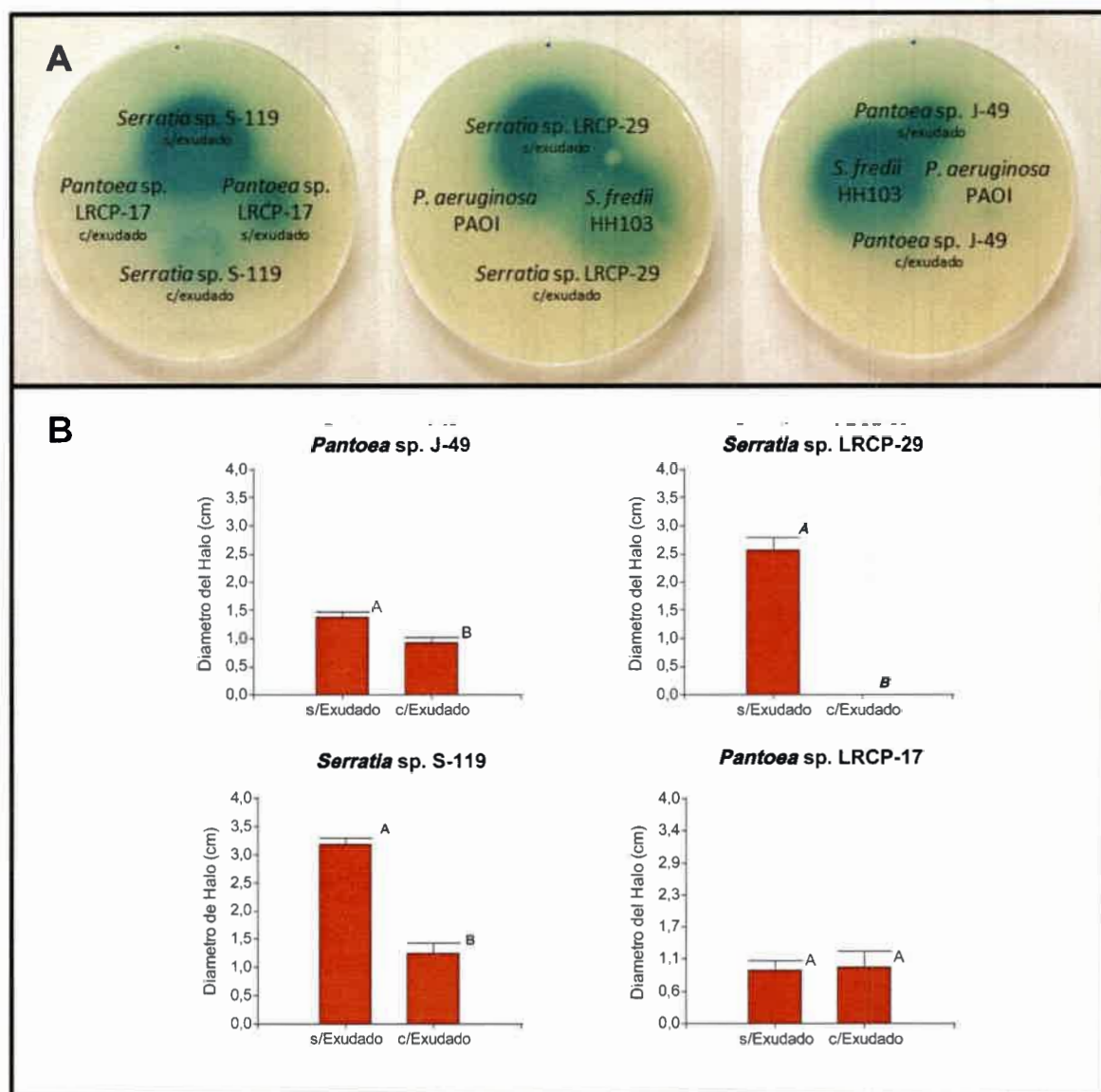


Figura 25. Efecto de la presencia de exudados radicales de colza sobre la producción de AHLs. A) Detección de AHL en presencia y ausencia de exudados utilizando la cepa biosensora *A. tumefaciens* NT1-pZLR4. B) Diámetro de los halos producidos. Los datos representan la media \pm E.S de dos replicas independientes con tres repeticiones cada una. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test DMS de Fisher.

Si se analizan en conjunto la formación de biofilm y la producción de AHLs de cada uno de los aislamientos en presencia de exudados, no se evidencia correspondencia entre ambas capacidades. Así, por ejemplo, la formación de biofilm de *Serratia sp. S119*, *Pantoea sp. J49* y *Pantoea sp. LRCP-17* se vio estimulada cuando crecieron en TSB_r10% conteniendo exudados. Sin embargo la producción de AHLs de *Serratia sp. S119* y *Pantoea sp. J49* disminuyó mientras que la de *Pantoea sp. LRCP-17* no se vio modificada (Fig. 22). De igual modo, aun cuando *Serratia sp. LRCP-29* y *Bacillus sp. LTAD-52* comparten la característica de ausencia de

producción de AHLs de cadena corta en presencia de exudados, sólo se modificó la capacidad de formar biofilm del primero de ellos.

A partir de los resultados obtenidos se concluye que, en las condiciones de este estudio, los exudados radicales de colza afectan la producción de AHLs de la mayoría de los aislamientos evaluados. Sin embargo, no siempre dicho efecto se traduce en una inhibición de la capacidad de formación de biofilm. Por lo tanto, y en concordancia con lo reportado por Perez Montaña y col. (2013), se puede especular que la planta de colza induciría o inhibiría los sistemas de *quórum sensing* dependiendo de la cepa bacteriana con la que se asocia.

Efecto de la inoculación de semillas de colza sobre la germinación y el crecimiento de la plántula

Esta bien descrito que la inoculación con PGPRs produce un incremento en el crecimiento de las plantas y en el rendimiento de cultivos de importancia agronómica (Asghar y col., 2002; Bashan y col., 2004; Biswas y col., 2000). La germinación de semillas y el desarrollo de plántulas de girasol fue promovido por la inoculación de bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Azotobacter* (Shaukat y col., 2006). En el cultivo de colza, la velocidad de germinación, emergencia y desarrollo de la plántula pueden ser determinantes para un mayor rendimiento, principalmente cuando las condiciones ambientales se tornan desfavorables. Un incremento en alguno de estos factores podría contribuir a optimizar el establecimiento de la planta y así redundaría en una mayor resistencia a bajas temperaturas e infecciones fúngicas. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó la capacidad de estimular la germinación de semillas de colza y el desarrollo de la plántula de los aislamientos solubilizadores de fosfato cuya inoculación incrementó el crecimiento de esta planta (*Bacillus* sp. LRCP-4, *Bacillus* sp. LRCP-3, *Bacillus* sp. LRCP-2, *Bacillus* sp. LTAD-52, *Pantoea* sp. LRCP-17, *Serratia* sp. LRCP-29 y *Arthrobacter* sp. LRCP-11), o de maní (*Serratia* sp. S119) (Taurian y col., 2010) en ensayos en maceta.

Entre los 2 y 4 días postinoculación se observó un incremento en el porcentaje de semillas germinadas en todos los tratamientos inoculados (con excepción de las inoculadas con *Bacillus* sp. LRCP-2). Sin embargo, a partir de los 5 días postinoculación, no se registraron diferencias con respecto a los controles (Fig. 26). En cuanto al crecimiento de las plántulas, aquéllas que provenían de semillas inoculadas

con *Bacillus* sp. LTAD-52 mostraron un incremento en la longitud de la parte aérea a los 7 días postinoculación, y fueron las únicas cuya longitud radical no se vió disminuida (Fig. 27). Estos resultados indicarían que la inoculación con dicho microorganismo contribuye a un mejor desarrollo de la plántula.

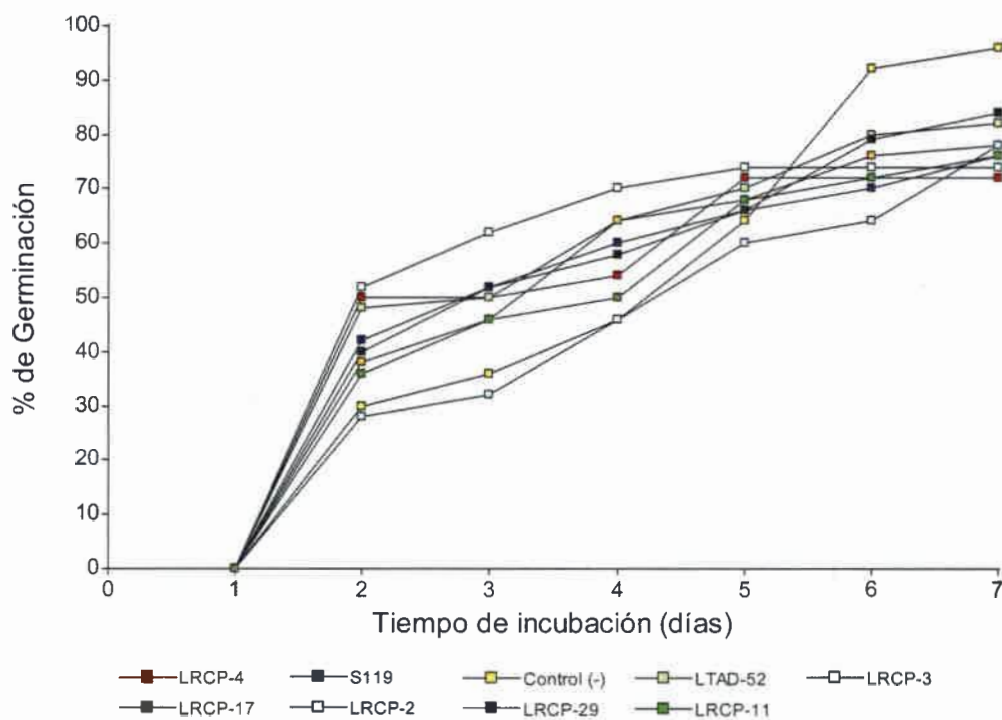


Figura 26. Efecto de la inoculación de semillas con bacterias solubilizadoras de fosfato sobre la germinación.

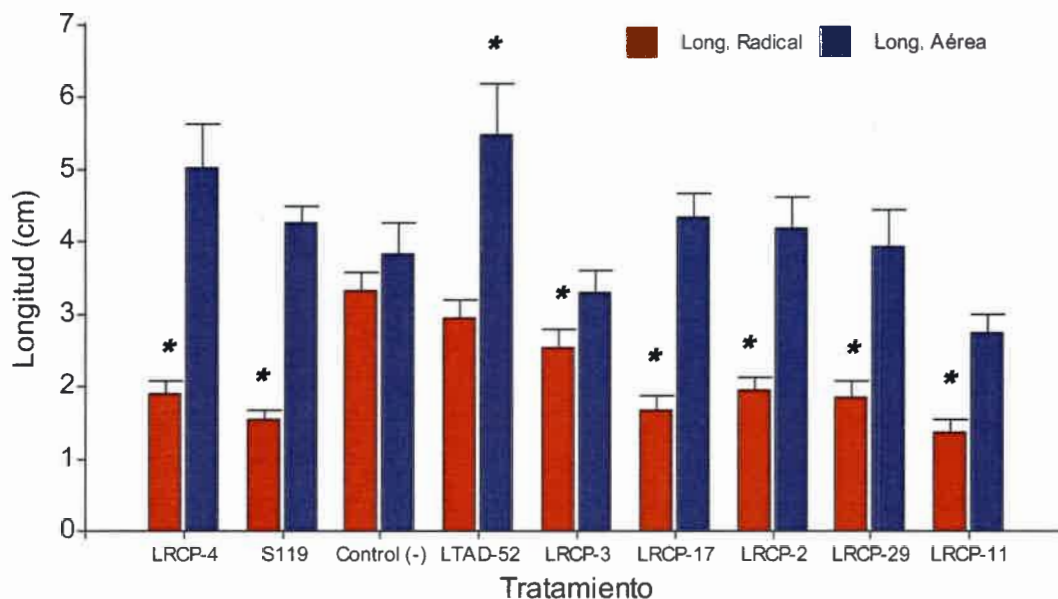


Figura 27. Efecto de la inoculación de semillas sobre la longitud aérea y radical de plántulas (7 días). Los datos representan la media \pm E.S de dos replicas independientes con cinco repeticiones cada una. * indica diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control negativo según el test DMS de Fisher.

Evaluación a campo del efecto de la inoculación de semillas de colza con bacterias solubilizadoras de fósforo y fijadoras de nitrógeno

La mayoría de los estudios realizados hasta el momento para evaluar el efecto de las PGPRs se han desarrollado bajo condiciones controladas. En muchos casos, cuando dichos estudios se realizaron en condiciones de campo, los resultados obtenidos no indicaron iguales beneficios (Riggs y col., 2001; Gyaneshwar y col., 2001). Algunos de los factores que pueden afectar el comportamiento de las bacterias en el suelo son el contenido de nitrógeno (Muthukumarasamy y col., 1999), el tipo de suelo (de Oliveira y col., 2006) y la edad y variedad de la planta huésped (Yanni y col., 1997; Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado 2003; de Oliveira y col., 2006).

En esta tesis, a partir de aislamientos bacterianos con actividad promotora del crecimiento vegetal obtenidos de plantas de colza se elaboraron inoculantes que fueron evaluados en ensayos a campo. Los mismos se obtuvieron en medio TSA y sus valores de UFC/ml se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Número de células viables de los inoculantes bacterianos.

<i>Aislamiento</i>	<i>UFC/ml</i>
<i>Bacillus</i> sp. LTAD-52	2,7 x10 ⁹
<i>Bacillus</i> sp. LRCP-2	3x10 ⁷
<i>Bacillus</i> sp. LRCP-3	1,3x10 ⁹
<i>Bacillus</i> sp. LRCP-4	2,3x10 ⁹
<i>Arthrobacter</i> sp. LRCP-11	1,23x10 ⁹
<i>Pantoea</i> sp. LRCP-17	2x10 ¹⁰
<i>Serratia</i> sp. LRCP-29	1,93x10 ¹⁰
<i>Bacillus</i> sp. LTAP-43	5x10 ⁹
<i>Arthrobacter</i> sp. LTAP-41	4,3x10 ⁹
<i>Bacillus</i> sp. LTAP- 42	9,66x10 ⁹

En la Chacra experimental de Barrow (Ministerio de Asuntos Agrarios Pcia Bs. As. – INTA) en Tres Arroyos se realizaron dos ensayos simultáneos. En uno de ellos se evaluó el comportamiento de las cepas solubilizadoras de fosfato, mientras que en el otro el de las cepas fijadoras de nitrógeno. Las propiedades físico-químicas del suelo donde se realizaron los ensayos así como las temperaturas y precipitaciones mensuales ocurridas durante el ciclo del cultivo se muestran en las tablas 12 y 13.

Tabla 12. Propiedades físico-químicas del suelo en el que se realizaron los ensayos a campo.

Contenido de P *	36.2 ppm
Contenido de Materia orgánica *	2.9 %
pH *	5.7
Contenido de NO₃**	0 – 20 cm: 59.6 ppm 20 – 40 cm: 40.2 ppm 40 – 60 cm: 16.6 ppm
Contenido de S total *	312.6 ppm
Contenido de S de SO₄**	0 – 20 cm: 17.1 ppm 20 – 40 cm: 13.5 ppm 40 – 60 cm: 12.9 ppm

* Muestra tomada de 0-20 cm de profundidad

** Muestra tomada de 0-20 cm, 20-40 cm y 40-60 cm de profundidad.

Tabla 13. Temperatura y precipitaciones ocurridas durante la campaña 2013.

Mes	T ^o media (°C)	T ^o máxima (°C)	T ^o mínima (°C)	Precipitaciones (mm)
Marzo	15.8	23.2	8.9	66.7
Abril	15.9	23.0	10.0	92.4
Mayo	10.7	17.0	5.1	27.0
Junio	8.2	15.3	1.5	3.4
Julio	7.3	12.6	2.6	75.1
Agosto	6.2	15.6	1.3	11.2
Septiembre	9.7	15.7	4.7	81.1
Octubre	14.9	21.4	7.9	83.4
Noviembre	17.9	24.8	10.0	55.9

a) Evaluación del efecto de la inoculación de bacterias solubilizadoras de fosfato

En ensayos a campo se han evaluado los efectos de la inoculación de diversas especies bacterianas solubilizadoras de fosfatos, capaces de promover el crecimiento de cultivos de garbanzo, trigo, maíz, caña de azúcar y cebada entre otros (Pal, 1998; Singh y Kapoor, 1999; Sundara y col., 2002; Zaidi y col., 2003; Babana y Antoun, 2006; Zaidi y Khan, 2006; Mehrvarz y col., 2008; Yazdani y col., 2009), Sin embargo, muy pocos estudios han sido realizados en el cultivo de colza.

En este ensayo se evaluaron los aislamientos solubilizadores de fosfato *Bacillus* sp. LRCP-4, *Bacillus* sp. LRCP-3, *Bacillus* sp. LRCP-2, *Bacillus* sp. LTAD-52, *Pantoea* sp. LRCP-17, *Serratia* sp. LRCP-29 y *Arthrobacter* sp. LRCP-11 ya que previamente mostraron incrementar el peso seco aéreo de plantas de colza en cámara de cultivo de plantas (Fig. 14).

Cuando las plantas alcanzaron el estadio de **roseta** (3 meses después de la siembra) no se observaron diferencias significativas en el peso seco aéreo entre las plantas inoculadas, las fertilizadas y los controles negativos. Idénticos resultados se obtuvieron cuando se evaluó el peso fresco aéreo, excepto en plantas inoculadas con *Bacillus* sp. LRCP-4 que mostraron un incremento en dicho parámetro, comparado con las fertilizadas (Fig. 28).

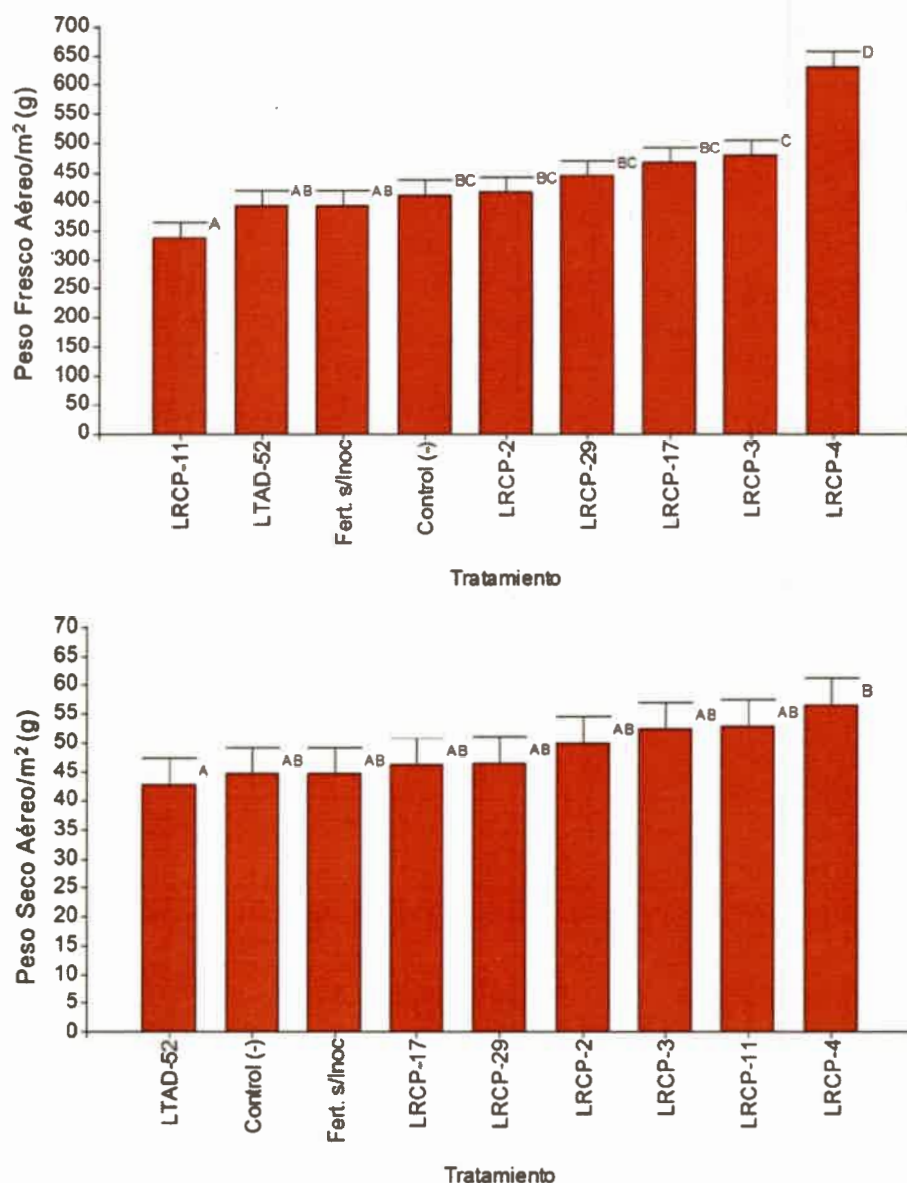


Figura 28. Efecto de la inoculación de bacterias solubilizadoras de fosfato sobre el peso seco y fresco aéreo en plantas en el estadio de roseta. Los datos representan la media \pm E.S. de tres replicas independientes con tres repeticiones cada una. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test DMS de Fisher.

Por el contrario, en el estadio de **floración**, las plantas inoculadas con *Bacillus* sp. LRCP-4, *Pantoea* sp. LRCP-17, *Arthrobacter* sp. LRCP-11 y *Bacillus* sp. LTAD-52 mostraron un incremento significativo en el peso fresco aéreo (Fig. 29). En cuanto al peso seco aéreo, sólo el de las inoculadas con *Bacillus* sp. LRCP-4 se vió incrementado en un 55% comparado con plantas fertilizadas. Cabe destacar que este aislamiento fue el único que también incrementó el peso fresco aéreo en el estadio de roseta. Al igual que lo ocurrido en dicho estadio, en floración no se observaron

diferencias en el peso seco aéreo de plantas fertilizadas (control positivo) y sin fertilizar (control negativo).

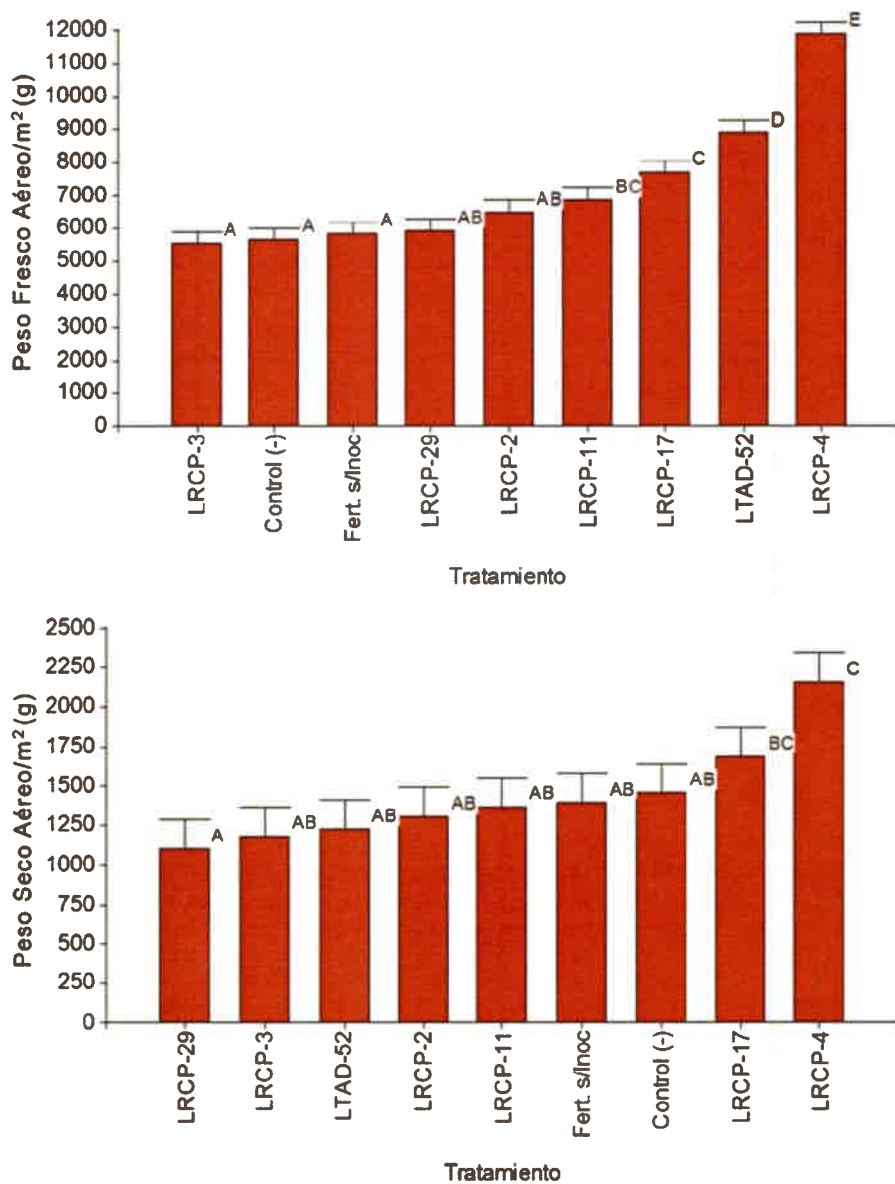


Figura 29. Efecto de la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfato sobre el peso seco y fresco aéreo en el estadio de floración. Los datos representan la media \pm E.S de tres replicas independientes con tres repeticiones cada una. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test DMS de Fisher.

En plantas en el estadio de **madurez** solo se evaluó el peso seco aéreo, encontrándose, como era esperable, valores significativamente menores en plantas sin fertilizar que en las fertilizadas. En este estadio se hizo aún más evidente la contribución de la inoculación, ya que el peso seco de las plantas inoculadas con

Bacillus sp. LRCP-2 y *Arthrobacter* sp. LRCP-11 alcanzó valores similares al de plantas fertilizadas, mientras que el de las inoculadas con *Bacillus* sp. LTAD-52, *Bacillus* sp. LRCP-4, *Pantoea* sp. LRCP-17 y *Serratia* sp. LRCP-29 lo superaron en hasta un 51% (Fig. 30).

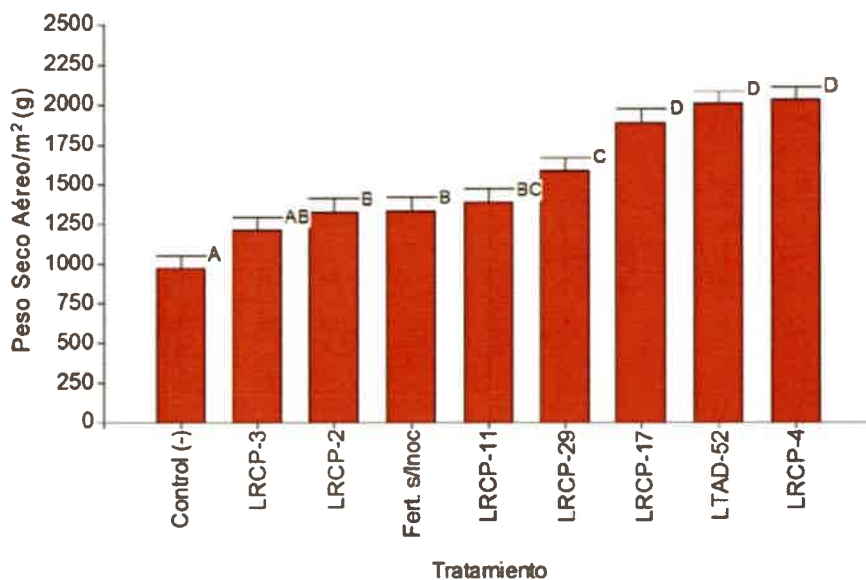


Figura 30. Efecto de la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfato sobre el peso seco aéreo en el estadio de madurez. Los datos representan la media \pm E.S de tres replicas independientes con tres repeticiones cada una. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test DMS de Fisher.

El contenido de P en las plantas fue determinado cuando éstas se encontraban en estadio de roseta. Los resultados obtenidos (Fig. 31) indicarían que los incrementos observados en el peso seco o fresco de dichas plantas no podrían ser atribuidos a la capacidad solubilizadora de fosfato de las bacterias. Esto es debido a que el contenido de P por planta no mostró diferencias significativas entre los distintos tratamientos, ni entre plantas fertilizadas y no fertilizadas. Esta ausencia de diferencias en el contenido de P entre las plantas de los distintos tratamientos probablemente se deba a que los requerimientos de dicho nutriente son cubiertos a partir del P disponible en el suelo.

En cambio, en el estadio de madurez, la evaluación del peso seco aéreo puso en evidencia una respuesta positiva no sólo a la fertilización fosfatada sino también a la inoculación. El hecho que el peso seco y fresco de algunas plantas inoculadas superara incluso los valores de las fertilizadas podría estar indicando la acción de otro mecanismo promotor del crecimiento, además de la solubilización de fosfato.

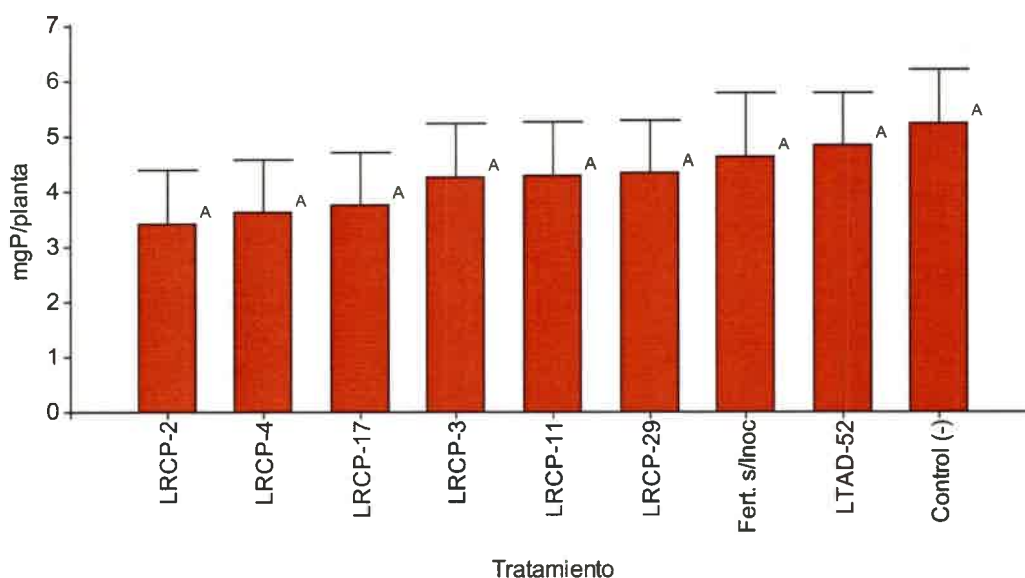


Figura 31. Efecto de la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfato sobre el contenido de fósforo por planta en el estadio de roseta. Los datos representan la media \pm E.S de tres replicas independientes con tres repeticiones cada una. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test DMS de Fisher.

Otro parámetro que mostró una respuesta positiva a la inoculación fue el **rendimiento de granos** ya que los valores obtenidos a partir de plantas inoculadas no difirieron de los de las fertilizadas (con excepción de las plantas inoculadas con *Bacillus* sp. LTAD-52), o incluso fueron superiores (en plantas inoculadas con *Serratia* sp. LRCP-29) (Fig. 32).

En cuanto al **peso de 1.000 granos**, no se observaron diferencias entre los distintos tratamientos y el control negativo, y a su vez, todos ellos mostraron valores significativamente inferiores al control fertilizado (Fig. 32). Si se relacionan estos resultados con el rendimiento de granos se deduce que la inoculación con todas las



bacterias solubilizadoras de fosfato evaluadas, excepto *Bacillus* sp. LTAD-52, promueve un aumento considerable en el número de granos producidos por hectárea.

El **índice de cosecha** es la relación entre el rendimiento de semilla y el total de materia seca acumulada por encima del suelo (Fageria, 1992). El elevado índice de cosecha determinado en plantas inoculadas con *Serratia* sp. LRCP-29 comparado con el control fertilizado (Fig. 32), indicaría un aumento de la eficiencia en la partición de asimilados al grano, evidenciado además, por un incremento en el rendimiento de plantas inoculadas con dicho aislamiento con respecto al control fertilizado.

Kloepper y col. (1988) inocularon semillas de colza con aislamientos solubilizadores de fosfato provenientes de la rizósfera de este cultivo y obtuvieron incrementos del 6 al 13% en el rendimiento. Más recientemente, y en concordancia con lo observado en este trabajo, Madani y col. (2011) reportaron un incremento en el rendimiento de colza a partir de la coinoculación con las bacterias solubilizadoras de fosfato *Pantoea agglomerans* P5 y *Pseudomonas putida* P13. Resultados similares fueron reportados por Mohammadi y col. (2012) coinoculando con las bacterias solubilizadoras de fosfato *Bacillus lentus* y *Pseudomonas putida*. Por otro lado, Dehpouri y col. (2015) evaluaron a campo la inoculación de colza con las bacterias solubilizadoras de fosfato *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* o la coinoculación de ambas, en combinación con distintas dosis de fósforo. Sólo a partir de plantas coinoculadas y fertilizadas (50 Kg P/ha) se lograron incrementos significativos en el rendimiento.

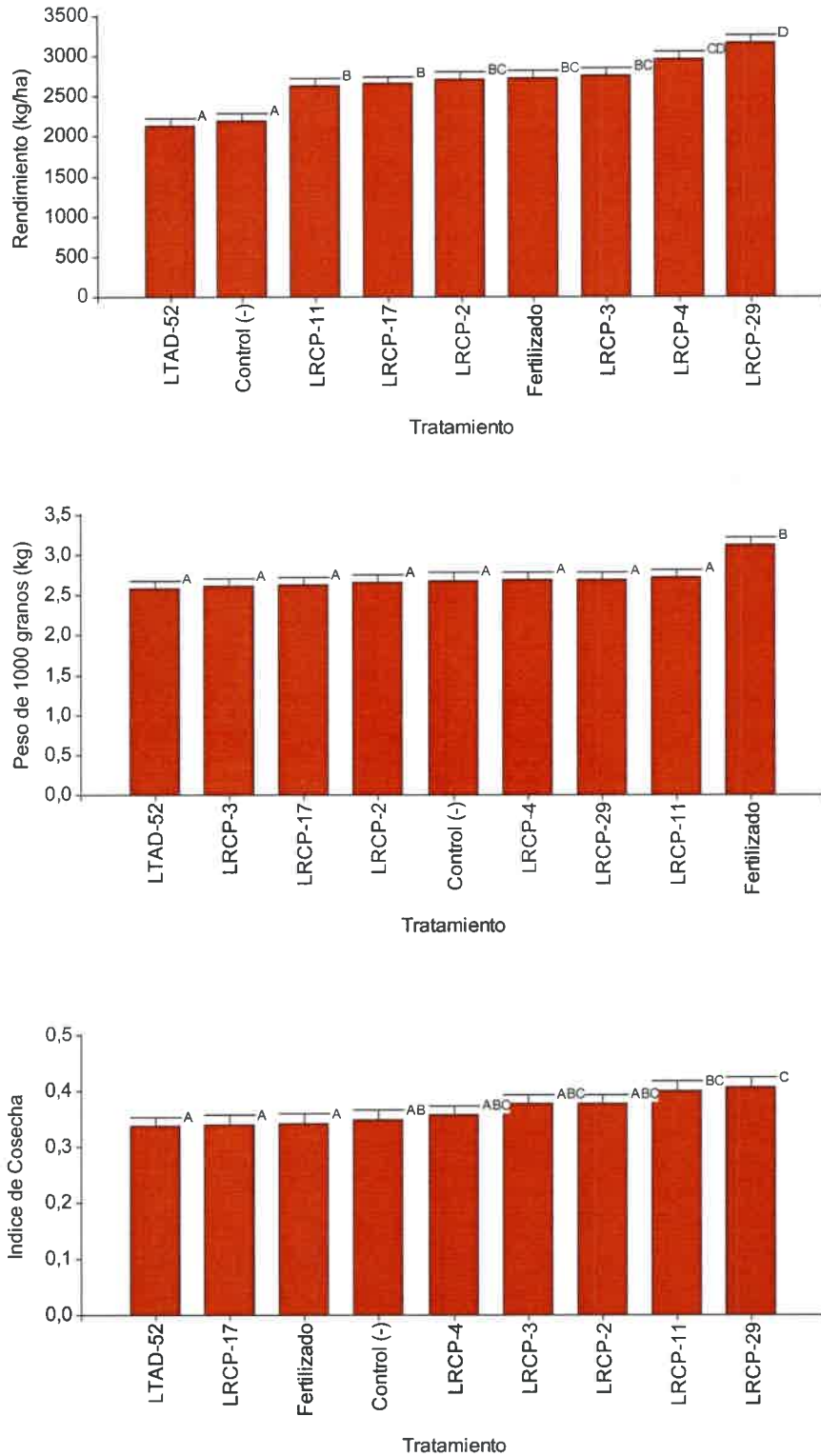


Figura 32. Efecto de la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfato sobre el rendimiento, peso de 1.000 granos e índice de cosecha. Los datos representan la media ± E.S de tres réplicas independientes con tres repeticiones cada una. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test DMS de Fisher.

b) Evaluación del efecto de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno

En base a los resultados obtenidos en los ensayos realizados en cámara de cultivo de plantas, se seleccionaron para evaluar a campo los aislamientos *Bacillus* sp. LTAD-52, *Bacillus* sp. LTAP-43, *Arthrobacter* sp. LTAP-41, *Bacillus* sp. LTAP-42, *Bacillus* sp. LRCP-4 y *Arthrobacter* sp. LRCP-11. La inoculación se realizó en la semilla y, además, el suelo en el que fueron sembradas se fertilizó con una concentración de nitrógeno reducida al 50% (30 Kg/ha). Las semillas no inoculadas se sembraron en suelo fertilizado con N50% o con N100% (60 Kg/ha).

En el estadio de **roseta** se observó una respuesta positiva a la fertilización nitrogenada, evidenciada en un incremento en el peso seco y fresco aéreo de plantas no inoculadas fertilizadas con N100% en relación a las fertilizadas con N50%. También se encontró una respuesta positiva a la inoculación suplementada con N50%, ya que dichos parámetros no difirieron o fueron superiores (en plantas inoculadas con *Arthrobacter* sp. LTAP-41) a los de las fertilizadas con N100% (Fig. 33).

En el cultivo de colza, la variable peso fresco en el estadio de roseta es utilizada para determinar el requerimiento de fertilizante nitrogenado y decidir la dosis a aplicar (Vandenberghe y col., 2010). Se considera que cuanto más elevados son los valores de peso fresco, menor es la cantidad de fertilizante nitrogenado requerido. En este sentido, el incremento en dicha variable inducida por la inoculación de *Arthrobacter* sp. LTAP-41 y *Bacillus* sp. LRCP-4 constituye un efecto deseable.

En el estadio de **floración** también se observó una respuesta positiva a la inoculación. Los valores de peso fresco aéreo de las plantas fertilizadas con N50% e inoculadas con *Bacillus* sp. LTAP-43 y *Arthrobacter* sp. LRCP-11 superaron los de las fertilizadas con N100%. Con los restantes inoculantes evaluados, este parámetro alcanzó valores superiores al de plantas fertilizadas con N50%, pero inferiores al de las fertilizadas con N100%. En cuanto al peso seco aéreo, con excepción de plantas fertilizadas con N50% e inoculadas con *Bacillus* sp. LTAD-52 o con *Bacillus* sp. LTAP-42, los valores obtenidos fueron siempre superiores al de plantas fertilizadas con N100% (Fig. 34).

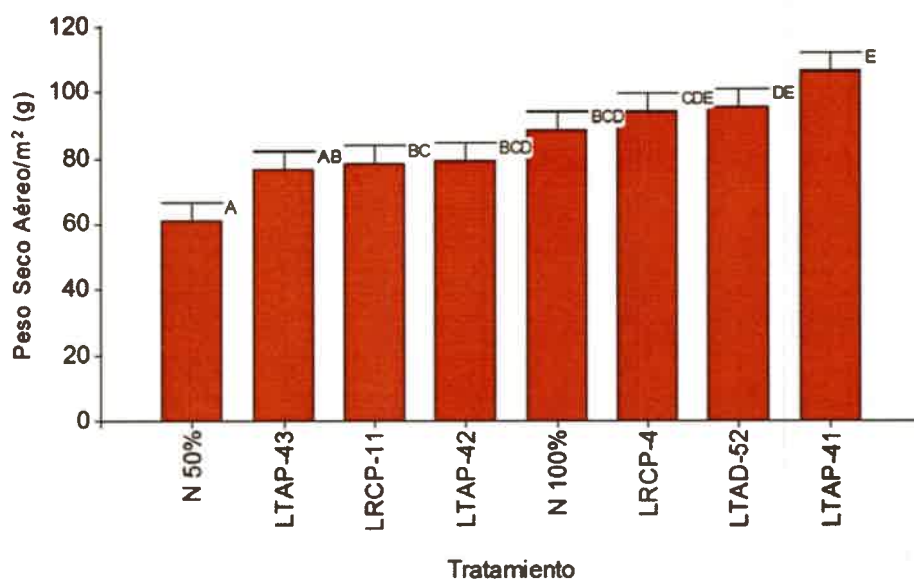
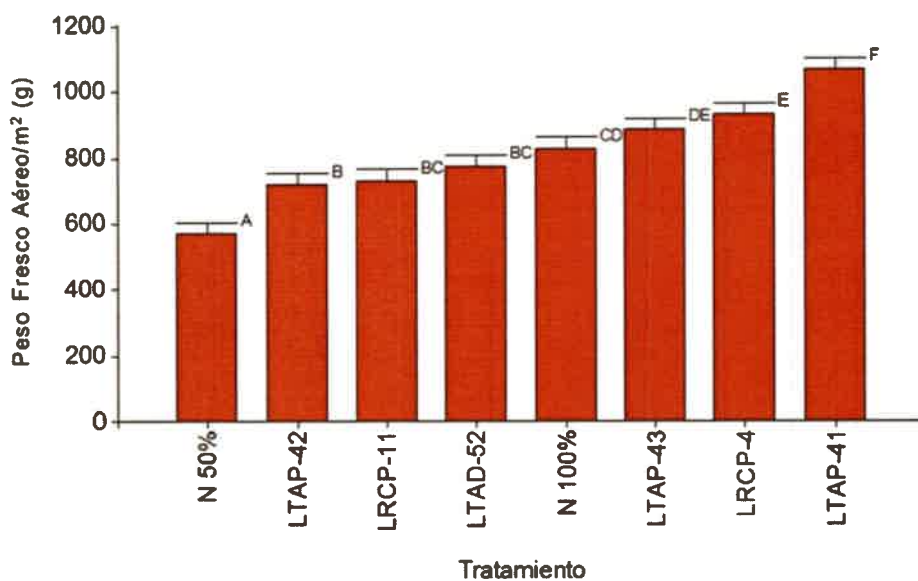


Figura 33. Efecto de la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno sobre el peso seco y fresco aéreo de plantas en el estadio de roseta. Los datos representan la media \pm E.S de tres réplicas independientes con tres repeticiones cada una. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test DMS de Fisher.

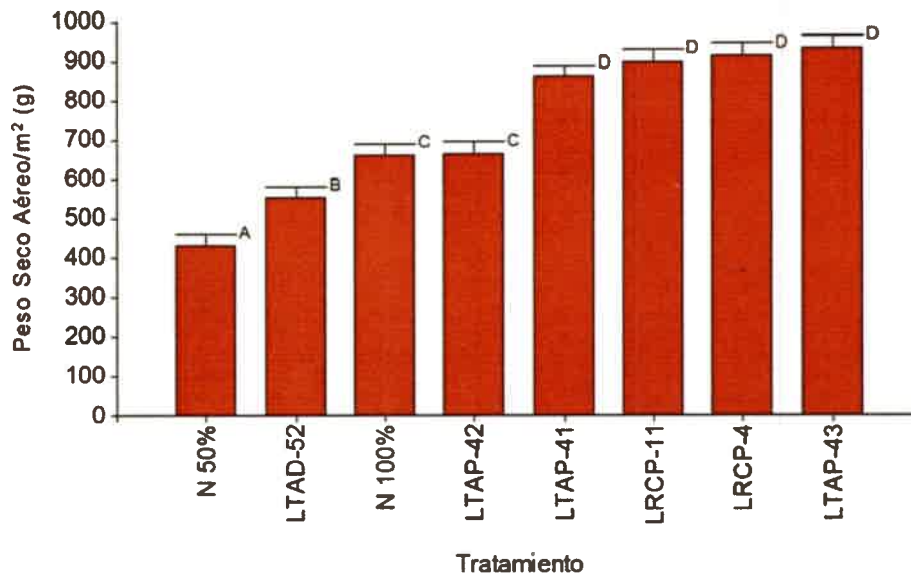
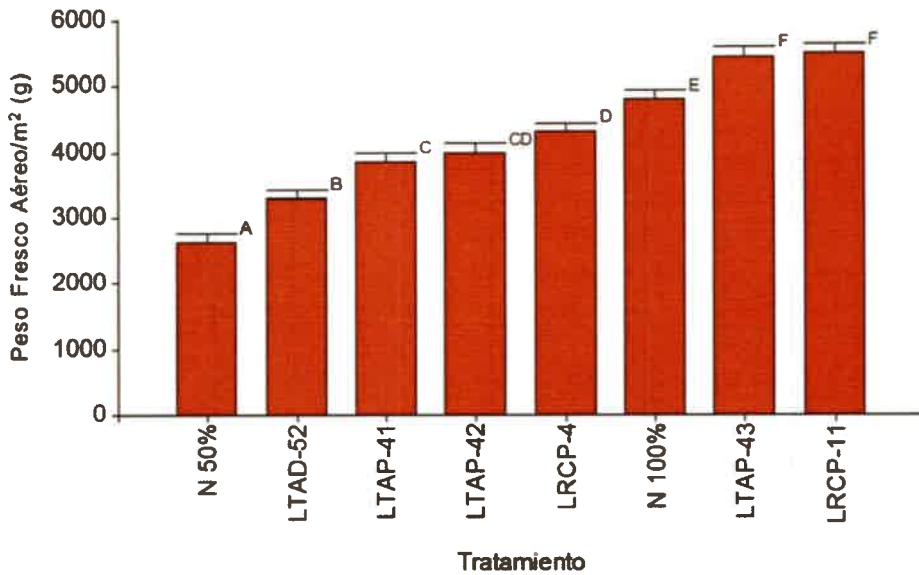


Figura 34. Efecto de la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno sobre el peso seco y fresco aéreo de plantas en el estadio de floración. Los datos representan la media \pm E.S. de tres réplicas independientes con tres repeticiones cada una. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test DMS de Fisher.

En **madurez**, a diferencia de lo observado en la etapa de floración, sólo las plantas fertilizadas con N50% e inoculadas con *Bacillus* sp. LTAD-52 alcanzaron los valores de biomasa de las fertilizadas con N100% (Fig. 35). Esto podría deberse al

menor requerimiento de nitrógeno cuando las plantas alcanzan este estadio (Orlovius, 2003; Iriarte y Valetti, 2008).

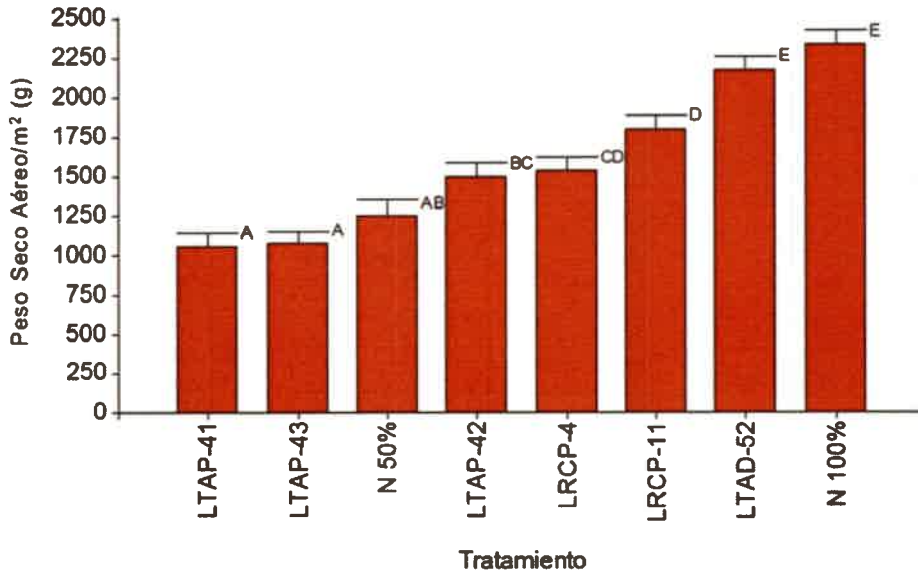


Figura 35. Efecto de la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno sobre el peso seco aéreo de plantas en el estadio de madurez. Los datos representan la media \pm E.S de tres réplicas independientes con tres repeticiones cada una. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test DMS de Fisher.

El contenido de nitrógeno fue evaluado en plantas en estadio de roseta. Se encontró que aquellas inoculadas con *Bacillus* sp. LRCP-4 y *Arthrobacter* sp. LRCP-11 y fertilizadas con N50% mostraban un aumento significativo en dicho contenido comparadas con plantas fertilizadas con N50% sin inocular, e incluso, en las inoculadas con *Arthrobacter* sp. LTAP-41, superior al de plantas fertilizadas con N100% (Fig. 36). Este aumento en el contenido de nitrógeno de plantas inoculadas con dichos aislamientos se correspondió con un incremento en la biomasa, por lo que se propone que el efecto promotor de crecimiento podría atribuirse a la capacidad de fijar nitrógeno de las bacterias inoculadas.

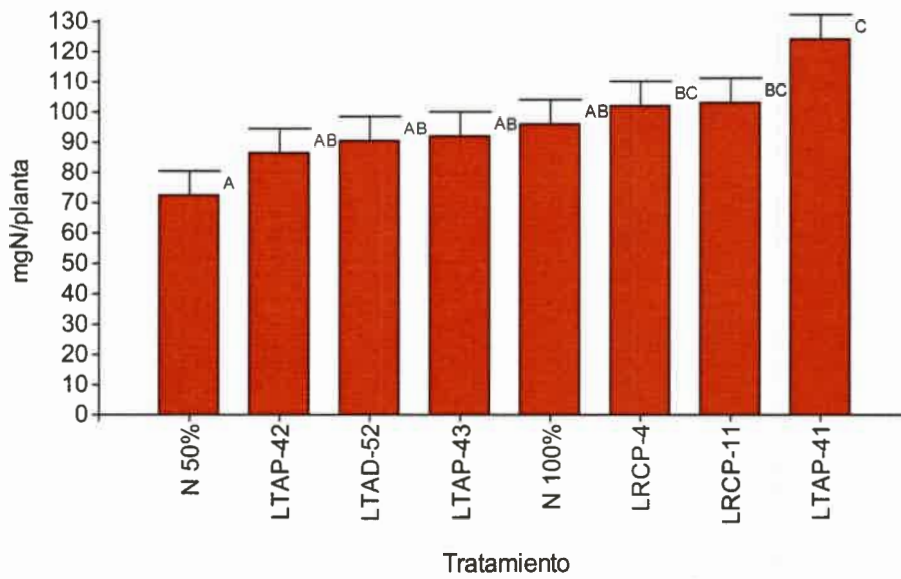


Figura 36. Efecto de la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno sobre el contenido de nitrógeno por planta en el estadio de roseta. Los datos representan la media \pm E.S de tres réplicas independientes con tres repeticiones cada una. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test DMS de Fisher.

Aun cuando en los diferentes estadios de desarrollo, y para algunos tratamientos, se observaron incrementos en la biomasa y/o en el peso fresco, ello no impactó en el rendimiento del cultivo, en el peso de 1.000 granos ni en el índice de cosecha. Tampoco se observaron diferencias entre plantas fertilizadas con N50% y con N100% en ninguno de dichos parámetros (Fig. 37).

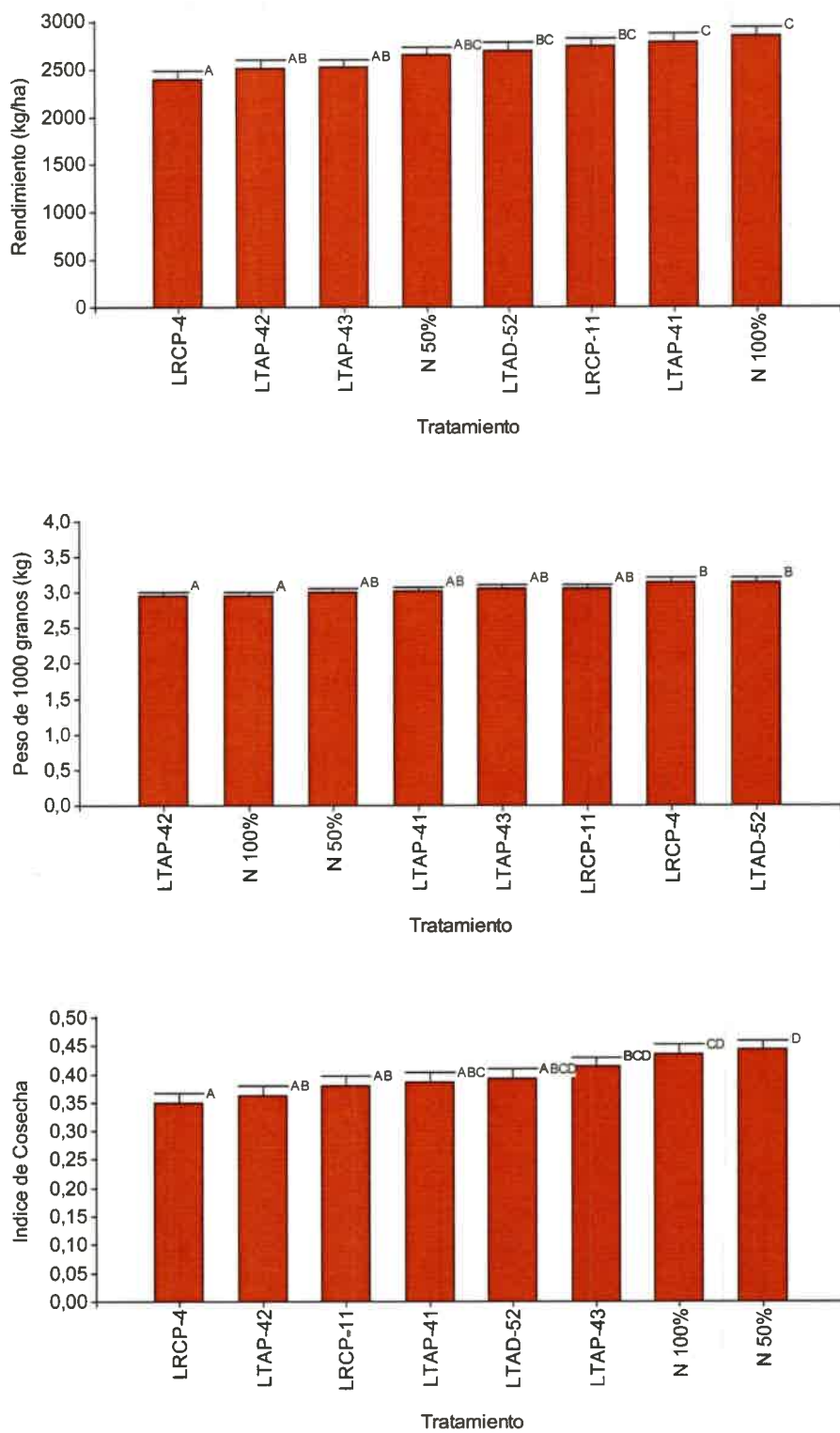


Figura 37. Efecto de la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno sobre el rendimiento, peso de 1.000 granos e índice de cosecha. Los datos representan la media ± E.S de tres réplicas independientes con tres repeticiones cada una. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test DMS de Fisher.

Existen reportes que muestran resultados contradictorios referidos al efecto de la fertilización nitrogenada sobre el índice de cosecha de colza. Así, Ghanbari-Malidarreh (2010) y Taheri y col. (2010) informaron que la fertilización de nitrógeno no modificó el índice de cosecha, mientras que Keivanrad y col. (2011) encontraron un aumento significativo.

A partir de los resultados obtenidos se concluye que, aun cuando la inoculación con cepas fijadoras de nitrógeno no incrementó el rendimiento, contribuyó a optimizar el establecimiento del cultivo y le otorgó mayor vigorosidad, a juzgar por el aumento en la producción de biomasa en los primeros estadios de desarrollo. Éstos son atributos deseables para el cultivo de colza ya que contribuirían a una mayor supervivencia de la planta frente a posibles condiciones adversas que afecten el desarrollo del cultivo en etapas tempranas (Iriarte y Valetti, 2008).

En numerosos trabajos se ha demostrado que el uso de bacterias fijadoras de nitrógeno en combinación con la fertilización nitrogenada permite reducir la cantidad de nitrógeno a aplicar en diferentes cultivos (Yanni y col., 1997; Saleh y col., 2001; Hasanalideh y Hojati, 2012). En colza, Franco y Morales (2006) informaron que la inoculación de la semilla con *A. brasilense* o la fertilización química no resultaron en incrementos en la biomasa aérea, el peso de granos, ni el rendimiento total. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los de otros autores quienes concluyen, a partir de estudios realizados en Iran y Egipto, que es posible obtener el mismo rendimiento de colza si se aplica la mitad de la dosis convencional de fertilizantes nitrogenados y se inocula simultáneamente con biofertilizantes (El-Howeity y Asfour, 2012; Naderifar y Deneshian, 2012a y 2012b).

En resumen, los resultados obtenidos en los ensayos realizados a campo, permiten concluir que la inoculación con algunos de los aislamientos solubilizadores de fosfato evaluados incrementó no sólo el crecimiento vegetal en comparación con el control fertilizado, sino también el rendimiento del cultivo. Con respecto a la inoculación de diazótrofos, se identificaron aislamientos cuya aplicación permitió reducir la fertilización de nitrógeno al 50% de la dosis habitual sin afectar la producción de biomasa vegetal y alcanzando rendimientos similares al control fertilizado.

Efecto de la inoculación de colza sobre el crecimiento de la planta, el desarrollo de nódulos y la micorrización de soja

Si bien no se han identificado micorrizas en plantas de la familia Cruciferaeae, a la que pertenece colza, (Azcón y Barea, 1997), poco se sabe del efecto del cultivo de colza sobre la micorrización de otras plantas que le siguen en la rotación. Dado que la soja es uno de los cultivos que habitualmente sigue a la colza, en este trabajo se propuso evaluar si el cultivo e inoculación de esta última especie, afecta el crecimiento, el proceso de nodulación y la micorrización de soja. Para ello, se sembraron semillas de soja en muestras de suelo provenientes de lotes en los que se había cultivado colza inoculada y sin inocular como fue descrito en Materiales y Métodos. Todos los tratamientos fueron inoculados con *Bradyrhizobium japonicum* E109, y se evaluaron distintos parámetros de crecimiento y de nodulación, además de la micorrización de sus raíces.

a) Efectos sobre el crecimiento y la nodulación en plantas de soja

No se observaron diferencias en los parámetros de crecimiento evaluados ni en el número de nódulos formados entre plantas cultivadas en suelo sin antecedentes o con antecedente de cultivo de colza sin inocular. Este último parámetro tampoco se modificó cuando las plantas de soja crecieron en suelos previamente cultivados con colza inoculada. Si se comparan los valores de peso fresco aéreo de plantas cultivadas en suelo con antecedentes de cultivo de colza sin y con inoculación, solo se observa un incremento significativo en las plantas de soja que crecieron en suelos donde había sido sembrado colza inoculada con *Arthrobacter* sp. LRCP-11 y *Bacillus* sp. LRCP-4. Sin embargo, este incremento se correspondió con un mayor peso seco aéreo solo cuando se inoculó *Bacillus* sp. LRCP-4 (Tabla 14). Los resultados indican que el crecimiento y la nodulación de plantas de soja, no se verían afectados por el cultivo previo de colza en el lote, aun cuando ésta sea inoculada con PGPRs.

Tabla 14. Parámetros de crecimiento y nodulación en plantas de soja creciendo en suelo proveniente de parcelas con o sin antecedentes de cultivo de colza inoculada o sin inocular.

	Procedencia del suelo*			
	T1	T2	T3	T4
PFA (g)	2,81±0,25 a	3,13±0,15 ab	3,71±0,18 bc	4,10±0,26 c
PSA (g)	0,81±0,08 a	0,86±0,04 ab	0,92±0,04 ab	1,01±0,07 b
PFR (g)	1,38±0,11 a	1,42±0,13 a	1,60±0,09 ab	1,84±0,17 b
PSR (g)	0,28±0,02 a	0,30±0,01 a	0,30±0,02 a	0,31±0,02 a
Nro Nod.	23±1 a	21±2 a	20±2 a	22±2 a
PSN (mg)	25,27±3,43 a	31,48±2,60 a	28,29±2,16 a	27,70±2,55 a
% NR	90,67±5,36 a	91,25±2,95 a	93,00±3,55 a	94,44±2,93 a

* Suelo proveniente de parcelas donde no se sembró colza, (T1); parcelas donde se sembró colza sin inocular, (T2); inoculada con *Arthrobacter* sp. LRCP-11, (T3); o con *Bacillus* sp. LRCP-4 (T4). PFA: peso fresco aéreo; PSA: peso seco aéreo; PFR: peso fresco radicular; PSR: peso seco radicular; Nro Nod.: Número de nódulos; PSN: peso seco de nódulos; % NR: porcentaje de nódulos rojos. Los datos representan la media ± E.S de dos réplicas independientes con cinco repeticiones cada una. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test DMS de Fisher.

b) Efecto de la inoculación de colza sobre la micorrización de raíces de plantas de soja

Considerando la contribución de la micorrización de cultivos de importancia agrícola en su producción, y que la soja le sigue a la colza en algunos esquemas de rotación, se evaluó si el cultivo previo de colza inoculada puede posteriormente afectar la asociación micorrícica en soja. En la figura 38 se muestran raíces de soja que se encuentran colonizadas por hifas, arbuscúlos y/o vesículas de hongos micorrícicos arbusculares. En todos los tratamientos se observó un mayor porcentaje de raíces colonizadas por hifas seguido por arbuscúlos y finalmente, por vesículas (Fig. 39). Dicha proporción se corresponde con el ciclo de vida de estos hongos (Bonfante y Perotto, 1995). Los porcentajes de colonización obtenidos en plantas cultivadas en suelo sin historia previa de colza fueron significativamente superiores a los observados en suelos con antecedentes de dicho cultivo. Por otro lado, cuando se compararon plantas crecidas en suelo previamente cultivado con colza inoculada y sin inocular no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados. Esto permite inferir que las bacterias inoculadas en el cultivo de colza no afectan la micorrización de raíces de soja cuando ésta le sigue en la rotación. Sin embargo,

dicha asociación simbiótica, se ve afectada cuando la planta de colza está presente como cultivo antecesor.

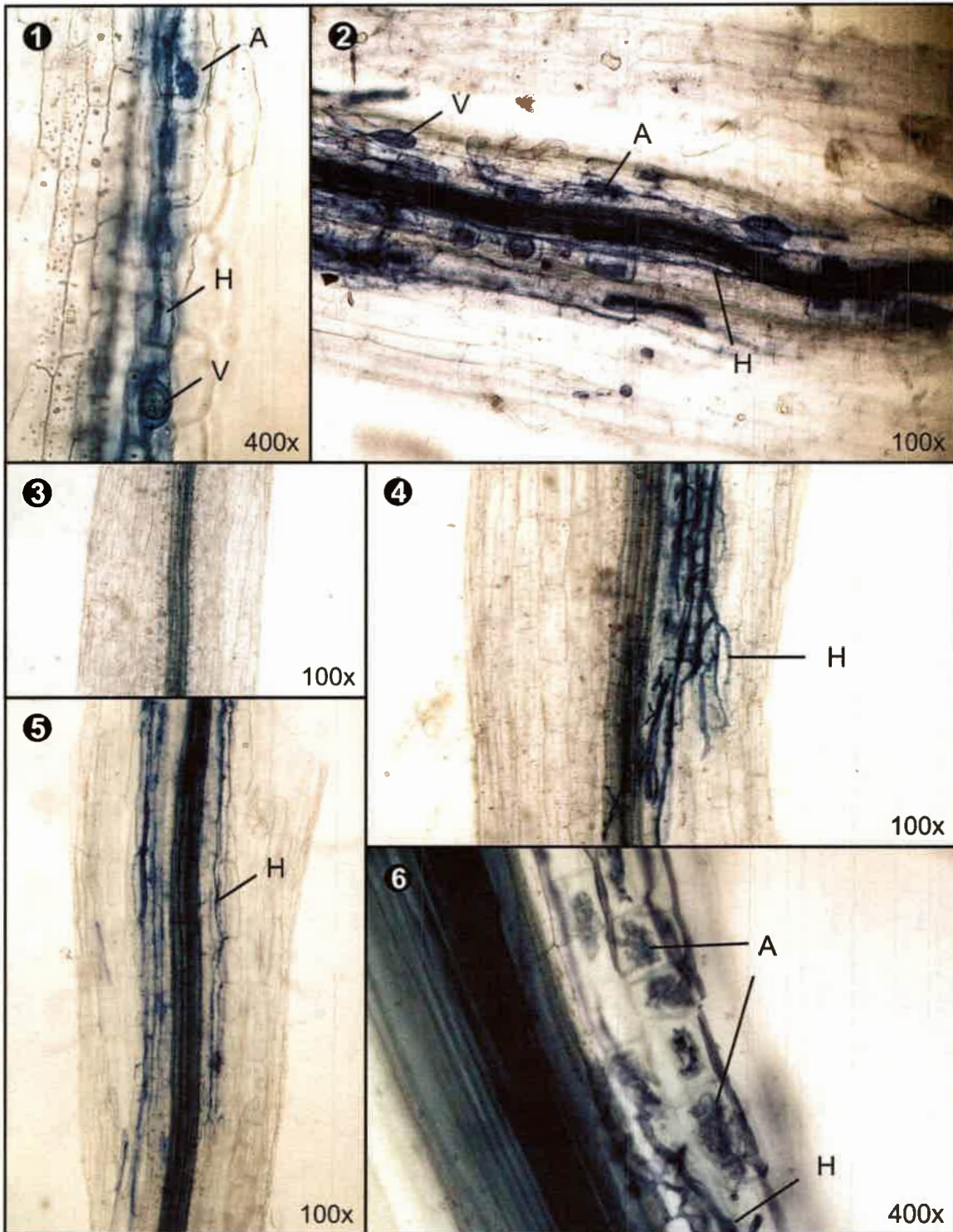


Figura 38. Raíces de soja teñidas con azul de tripán. 1) y 2) Segmentos de raíces colonizadas con hifas, arbusculos y vesículas micorrícicas; 3) Segmento de raíz no colonizado por micorrizas; 4) y 5) Segmentos de raíz colonizado por hifas de micorrizas; 6) Detalle de los arbusculos micorrícicos. H: Hifas micorrícicas A: Arbusculos micorrícicos V: Vesículas micorrícicas

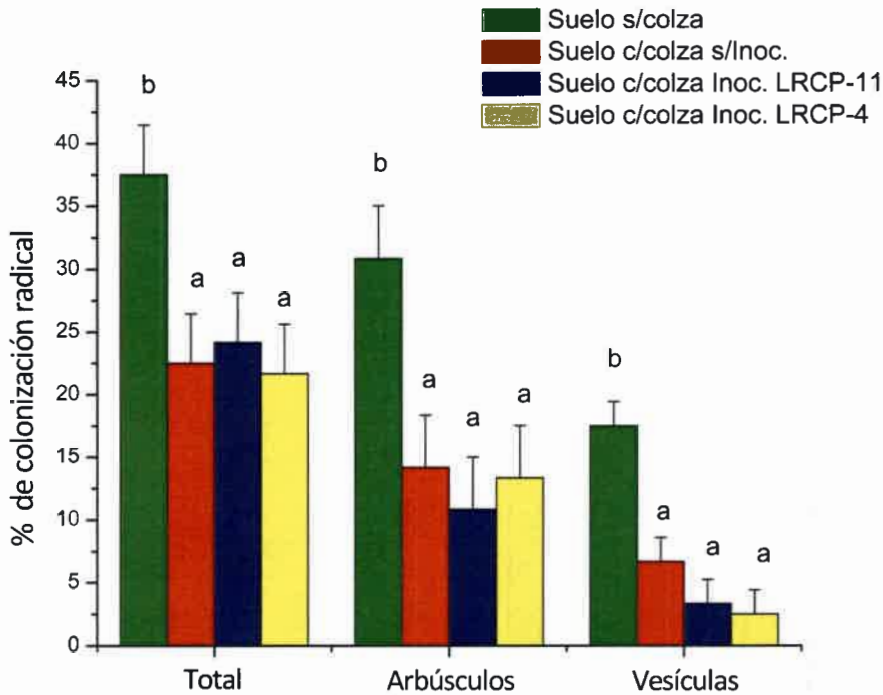


Figura 39. Porcentaje de colonización radical de plantas de soja por hongos micorrízico-arbusculares. Los datos representan la media \pm E.S de dos réplicas independientes con tres repeticiones cada una. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test DMS de Fisher para cada variable evaluada.

En la bibliografía existen escasos y contradictorios antecedentes respecto al efecto del cultivo de colza sobre la micorrización de las raíces de las plantas que lo suceden. A diferencia de lo observado en este trabajo, Pellerin y col. (2007) reportaron que la incorporación al suelo de residuos de plantas de colza no afectó la colonización de las raíces de maíz por hongos micorrízicos. Por el contrario, y en concordancia con lo observado en este trabajo, se ha reportado un efecto negativo del cultivo previo de colza sobre la colonización de hongos micorrízico-arbusculares en raíces de maíz (Gavito y Miller, 1998a, 1998b; Arihara y Karasawa, 2000). Los autores proponen que dicho efecto puede deberse a: (i) Una reducción del tamaño de la población de dichos hongos en el suelo. Los propágulos fúngicos constituidos por trozos de raíces colonizadas, esporas y segmentos de hifas, que se encuentran en el horizonte superficial del suelo (Bellgard, 1993), podrían ser afectados en la rotación por el establecimiento de cultivos no micotróficos como colza (Castillo y col., 2008), y (ii) La producción de compuestos antifúngicos por las raíces y/o residuos de colza. Se conoce que plantas de la familia Brassicaceae contienen tioglucósidos (compuestos

isotiocianatos que se producen cuando se destruyen los tejidos) que ejercen un efecto negativo en el desarrollo de micorrizas vesículo-arbusculares y en la germinación de esporas (Vierheilig y Ocampo, 1990; Schreiner y Koide, 1993a, b).

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el cultivo de colza tiene un efecto negativo en la micorrización de soja cuando éste le sigue en la rotación, pero que la nodulación y el crecimiento de esta leguminosa no son afectados.

CAPITULO 5

Conclusión

En la actualidad, la población humana mundial asciende a 7 mil millones y se espera que aumente a 8 mil millones en el año 2020, por lo que será un desafío importante en los próximos años la implementación de estrategias que garanticen satisfacer las necesidades alimentarias de una población mundial en expansión. En este sentido, uno de los principales objetivos planteados por los investigadores del sector agroalimentario es aumentar en gran medida la productividad agrícola, y hacerlo de una manera sustentable y respetuosa con el medio ambiente. El uso de fertilizantes químicos para mejorar la productividad de los cultivos puede tener como consecuencia efectos ambientales nocivos y está acompañado por un aumento exponencial en el consumo de formas no renovables de energía. Indudablemente, la eliminación de dicha práctica podría conducir a una disminución drástica de la producción de alimentos.

Una alternativa al uso de agroquímicos es la inoculación con bacterias PGPRs. Estas pueden mejorar el crecimiento de las plantas a partir de una amplia variedad de mecanismos como la solubilización de fosfatos y la fijación de nitrógeno, entre otros. La potencialidad en cuanto a la promoción de crecimiento vegetal y aplicación de las PGPRs en la agricultura se incrementa de manera constante debido a los recientes avances en la comprensión de la interacción microorganismo-planta. En varios países ya se están comercializando productos que contienen PGPRs para diferentes cultivos. La colza, sin embargo, ha sido poco estudiada en este aspecto, aún cuando es el segundo cultivo oleaginoso más importante en el mundo después de la soja.

Con el objetivo de realizar un aporte biotecnológico que contribuya al desarrollo sostenido del cultivo en nuestro país, en este plan de tesis se propuso identificar bacterias aisladas de la rizósfera de colza potencialmente útiles para incrementar el crecimiento vegetal por medio de la fijación biológica de nitrógeno y/o la solubilización de fósforo. También se planteó evaluar a campo su utilización como inoculantes, aportando de este modo al desarrollo de una agricultura sustentable.

Si bien existen algunos reportes acerca de la diversidad de las comunidades microbianas asociadas con las raíces del cultivo de colza, así como de los aspectos que influyen en dicha diversidad y de su potencial uso como PGPRs, en nuestro país no han sido realizados estudios con tal fin. Los resultados presentados en este trabajo amplían el conocimiento de la diversidad de bacterias asociadas a la planta de colza, describiendo por primera vez los géneros *Bacillus*, *Serratia*, *Arthrobacter* y *Pantoea* capaces de incrementar su crecimiento.

Los exudados radicales juegan un papel importante en las interacciones microorganismo-planta. Resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir que los compuestos exudados por las raíces de plantas de colza no afectan el crecimiento y la supervivencia de las PGPRs evaluadas y, aún cuando modifican la producción de AHLs de alguna de ellas, en la mayoría de los aislamientos estimulan la formación de biofilm. Sin embargo, la eficiencia en la promoción de crecimiento de los aislamientos estudiados parece no depender de dicha capacidad.

Es importante tener en cuenta que los resultados obtenidos *in vitro* sobre la promoción del crecimiento vegetal mediada por PGPRs no siempre se reproducen bajo condiciones de campo. Existen diversos factores ambientales que pueden afectar el comportamiento bacteriano. La capacidad competitiva y de adaptación al ambiente son factores de suma importancia. Por lo tanto, es imprescindible evaluar la eficiencia de las bacterias en la promoción del crecimiento vegetal mediante el desarrollo de ensayos a campo, previo a considerarlas adecuadas para la producción de inoculantes.

En este trabajo de tesis, la inoculación a campo de algunos aislamientos solubilizadores de fosfato incrementó no sólo el crecimiento vegetal, sino también el rendimiento del cultivo, el que alcanzó valores similares o incluso superiores al control fertilizado. En cuanto al aporte de nitrógeno mediante la fijación biológica, se demuestra que la inoculación con diazótrofos seleccionados permitiría reducir la aplicación de fertilizantes nitrogenados al 50% de la dosis habitual sin afectar el rendimiento del cultivo. Más aún, en este trabajo también se demuestra que la práctica de inoculación mejora la implantación del cultivo en los primeros estadios de desarrollo otorgándole mayor vigor a las plantas y, como consecuencia, les conferiría mayor competitividad frente a las malezas, mayor capacidad de defensa ante el ataque de patógenos y menor sensibilidad a las bajas temperaturas. Los estudios realizados en esta tesis demuestran, por lo tanto, que el cultivo de colza presenta una importante respuesta a la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfato y fijadoras de nitrógeno en condiciones a campo, por lo que el uso de dicha práctica permitirá no solo disminuir los costos de producción sino también la contaminación del medio ambiente. Considerando los resultados obtenidos, se pueden identificar dos aislamientos con mayor potencial para ser utilizados como inoculantes en el cultivo de colza. Uno de ellos es el aislamiento solubilizador de fosfato *Serratia* sp. LRCP-29, cuya inoculación permitió que el rendimiento del cultivo superara incluso al del control fertilizado. El otro es el aislamiento fijador de nitrógeno *Bacillus* sp. LTAP-41, cuya

inoculación incrementó el contenido de nitrógeno de las plantas y permitió disminuir al 50% la dosis habitual de fertilizante nitrogenado aplicado sin afectar el rendimiento del cultivo. Además, se identificó el aislamiento *Arthrobacter* sp. LRCP-11 cuya utilización en la producción de inoculantes tendría la ventaja sobre los anteriores de incrementar el crecimiento vegetal mediante la solubilización de fósforo y, además, la fijación de nitrógeno.

A pesar de los recientes avances en la tecnología asociada a la producción de inoculantes, su comercialización exige extensa optimización y evaluación de los posibles efectos secundarios de su aplicación. Es necesario conocer si la introducción en el suelo de un microorganismo afecta la diversidad del microbioma rizosférico y sus interacciones. El aporte de esta tesis en este aspecto consiste en haber demostrado que la introducción de bacterias promotoras del crecimiento vegetal no afecta la nodulación, el crecimiento y la micorrización de plantas de soja, aunque esta última se ve disminuida cuando la colza se encuentra como cultivo antecesor. La inoculación de soja con hongos micorrícicos podría contrarrestar este efecto.

En síntesis, este trabajo de tesis proporciona nuevos conocimientos sobre las interacciones bacterias diazótroficas y/o solubilizadoras de nitrógeno-colza y aporta al desarrollo de una estrategia biotecnológica, aún no implementada en dicho cultivo, que posibilitaría incrementar su rendimiento en el marco de una agricultura sustentable.

Perspectivas futuras

La producción de inoculantes a gran escala requiere obtener formulaciones con altas concentraciones de microorganismos seleccionados por su efectividad, competitividad y capacidad de promover el crecimiento de la especie vegetal en diferentes condiciones edafo-ecológicas. A su vez, le debe brindar a la bacteria estabilidad durante la producción, distribución comercial, almacenamiento y transporte. La formulación y el método de aplicación elegido determinan el éxito potencial del inoculante.

Teniendo en cuenta la respuesta positiva que presentó el cultivo de colza a la inoculación, se propone continuar los estudios tendientes a optimizar el desarrollo de esta tecnología. Algunos de los aspectos que debieran ser abordados con tal fin se listan a continuación:

- Evaluar, en distintas condiciones edáficas, el comportamiento de los inoculantes formulados en base a las cepas aquí seleccionadas como así también el método de inoculación apropiado.
- Analizar el contenido de aceites y proteínas del grano de plantas inoculadas para determinar si estas características son modificadas como consecuencia de la inoculación.
- Evaluar el potencial que posee *Arthrobacter* sp. LRCP-11 y *Bacillus* sp. LRCP-4 para incrementar tanto los niveles de nitrógeno como los de fósforo soluble, cubriendo de este modo ambos requerimientos mediante la aplicación de un inoculante formulado en base a una única bacteria, que muestra ambas capacidades.
- Establecer criterios para el desarrollo, comercialización y aplicación del inoculante a gran escala, evaluando la formulación de medios de cultivo, soporte, concentración, viabilidad de las bacterias por largos periodos de tiempo, temperatura de almacenamiento, método de inoculación, etc, a los fines de maximizar el potencial de la bacteria y obtener los mayores rendimientos posibles.
- Evaluar el comportamiento de un inoculante mixto elaborado en base al microorganismo solubilizador de fosfato *Serratia* sp. LRCP-29 y el fijador de nitrógeno *Bacillus* sp. LTAP-41. El desarrollo de este tipo de inoculantes requiere estudios en cuanto a la 1) compatibilidad entre las poblaciones microbianas, tiempo de generación, requerimientos nutricionales, condiciones de crecimiento, etc. 2) interacción con las plantas 3) eficiencia de sus efectos promotores del crecimiento.

CAPITULO 6

Bibliografía

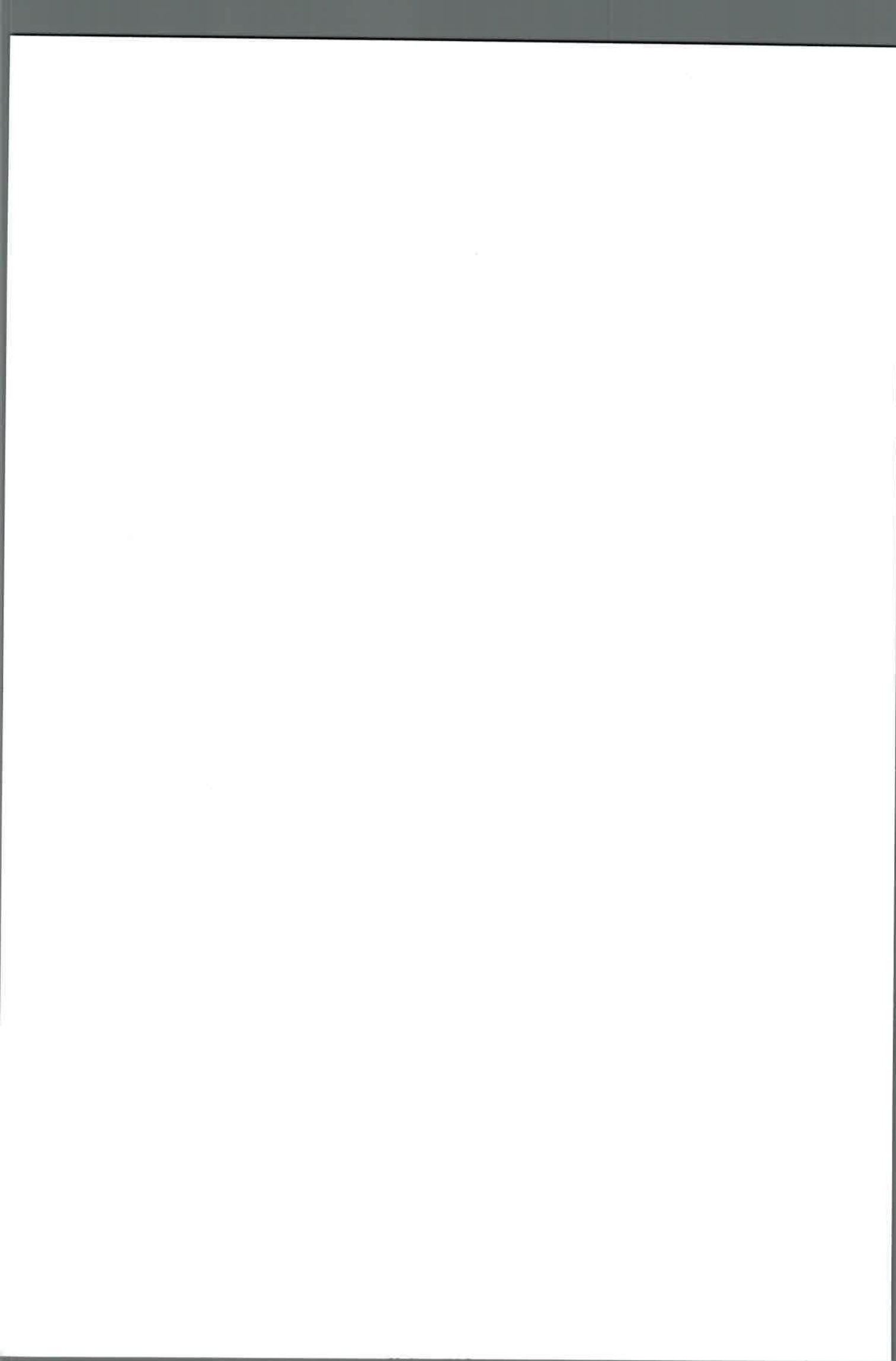
BIBLIOGRAFÍA

- Adesemoye, A.O., Torbert, H.A., Kloepper, J.W. (2008). Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. *Can. J. Microbiol.* 54:876-886.
- Adesemoye, A.O., Kloepper, J.W. (2009). Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer use efficiency. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85:1-12.
- Ahmed, H.F.S., El-araby, M.M.I. (2012). Evaluation of the influence of nitrogen fixing, phosphate solubilizing and potash mobilizing biofertilizers on growth, yield, and fatty acid constituents of oil in peanut and sunflower. *African J. Biotechnol.* 11(43):10079-10088.
- Alexander, M. (1980). Transformaciones microbianas del fósforo. (p.: 355-371). En: *Introducción a la microbiología del suelo*. AGT editor, México, 491 p.
- Alexandre, G., Zhulin, I.B. (2007). Chemotaxis in soil diazotrophs: survival and adaptive response. In: Elmerich, C., Newton, W.E.. eds. *Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 73-84.
- Allison, D.G., Ruiz, B., Carmen, S., Jaspe, A., Gilbert, P. (1998). Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* 167(2):179-184.
- Altschul, S., Madden, T., Schäffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Alvarez, B.D. (2009). En: "Biofertilizantes como insumos en agricultura sostenible": Editorial Universitaria, INIFAT. Ciudad de La Habana.
- Andreeva, L.P., Red'kina, T.V., Ismailov, S.F. (1993). The involvement of indoleacetic acid in the stimulation of Rhizobium-legume symbiosis by *Azospirillum brasilense*. *Russ. J. Plant Physiol.* 40:901-906.
- Anzuay, M. S., Frola, O., Angelini, J. G., Ludueña, L. M., Ibañez, F., Fabra, A., Taurian, T. (2015). Effect of pesticides application on peanut (*Arachis hypogaea* L.) associated phosphate solubilizing soil bacteria. *Applied. Soil. Ecol.* 95:31-37.
- Ardakani, S.S., Heydari, A., Tayebi, L., Mohammadi, M. (2010). Promotion of cotton seedlings growth characteristics by development and use of new bioformulations. *Int. J. Bot.* 6(2):95-100.

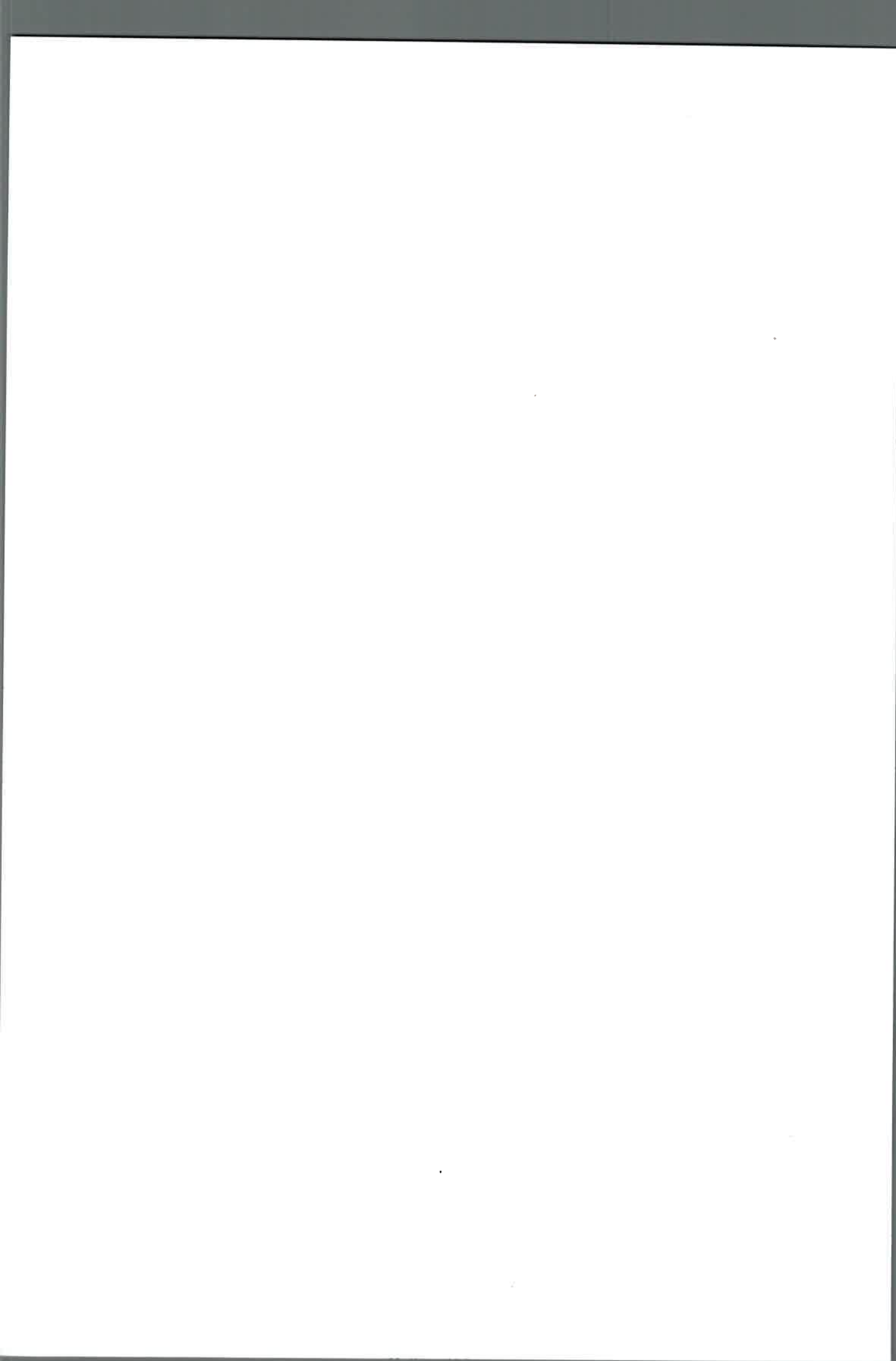
- Arihara, J., Karasawa, T. (2000). Effect of previous crops on arbuscular mycorrhizal formation and growth of succeeding maize. *Soil Sci. Plant Nutr.* 46:43-51.
- Arora, D., Gaur, C. (1979). Microbial solubilization of different inorganic phosphates. *Indian J. Exp. Biol.* 17:1258-61.
- Asghar, H.N., Zahir, Z.A., Arshad, M., Khaliq, A. (2002). Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth promoting activities in *Brassica juncea* L. *Bio. Fertil. Soil.* 35:231-237.
- Azcón, R., Barea, J. (1997). Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens-an overview of the mechanisms involved. *Appl. Soil Ecol.* 7: 83-92.
- Babana, A., Atoun, H. (2006). Biological system for improving the availability of Tilemsi phosphate rock for wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivated in Mali. *Plant Soil.* 287:51-58.
- Bais, H.P., Fall, R., Vivanco J.M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol.* 134:307-319.
- Bais, H.P., Weir, L.P., Perry, L.G., Gilroy, S. Vivanco, J.M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:233-266.
- Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., Döbereiner, J. (2000). Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia spp.* *Biol Fert Soils.* 30:485-491.
- Bashan, Y., Holguin G., de-Bashan, L.E (2004). *Azospirillum*- plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances. *Can. J. Microbiol.* 50:521-577.
- Bauer, W.D. Mathesius, U. (2004). Plant responses to bacterial quorum sensing signals. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:429-433.
- Bazin, M. J., Markham, P., Scott, E. M., Lynch, J. M. (1990). Population dynamics and rhizosphere interactions. In "The Rhizosphere" (ed. Lynch, J. M.). John Wiley & Sons, New York, 99-127.
- Bellgrad, S.E. (1993). The topsoil as the major store of propagules of vesicular-arbuscular fungi in southeast Australian sandstone soils. *Mycorrhiza* 3:19-24.
- Bertrand, H., Nalin, R., Bally, R., Cleyet-Marel, J. (2001). Isolation and identification of the most efficient plant growth-promoting bacteria associated with canola (*Brassica napus*). *Biol. Fertil. Soils* 33:152-156.

- Besserer, A., Puech-Pagés, V., Kiefer, P., Gomez-Roldan, V., Jauneau, A. (2006). Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biol.* 4:1239-47.
- Besserer, A., Bécard, G., Jauneau, A., Roux, C., S´ejalon-Delmas, N. (2008). GR24, a synthetic analog of strigolactones, stimulates the mitosis and growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* by boosting its energy metabolism. *Plant Physiol.* 148:402-13.
- Bhattacharjee, R.B., Singh, A., Mukhopadhyay, S.N. (2008). Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertilizer for non-legumes: prospects and challenges. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80:199-209.
- Bhattacharyya, P.N., Jha, D.K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28:1327-1350.
- Biswas, J.C., Ladha, L.K., Dazzo, F.B., (2000). Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. *J. Soil. Sci.* 64:1644-1650.
- Bonfante, P., Perotto, S. (1995). Tansley Review No. 82 Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytol.* 3-21.
- Bringham, R.M., Cardon, Z.G., Gage, D.J. (2001). Galactosides in the rhizosphere: utilization by *Sinorhizobium meliloti* and development of a biosensor. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4540-4545.
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., Malajczuk, N. (1996). Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, Australia.
- Bürgmann, H., Widmer, F., Von Sigler, W., Zeyer, J. (2004). New molecular screening tools for analysis of free-living diazotrophs in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(1):240-247.
- Carré, P., Pouzet, A. (2014). Rapeseed market, worldwide and in Europe. *Oilseeds and fats crops and lipids OCL.* 21(1).
- Case, R.J., Labbate, M., Kjelleberg, S. (2008). AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria. *Isme. J.* 2:345-49.
- Castillo, C., Astroza, I., Borie, F., Rubio, R. (2008). Efecto de cultivos hospederos y no micorrizicos arbusculares. *J. Soil Sc. Plant Nutr.* 8:37-54.
- Cattelan, A.J., Hartel, P.G., Fuhrmann, J.J. (1999). Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63:1670-1680.

- Cha, C., Gao, P., Chen, Y., Shaw, P. D., Farrand, S. K. (1998). Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *M.P.M.I.* 11(11):1119-1129.
- Chabot, R., Beauchamp, C.J., Kloepper, J.W., Antoun, H. (1998). Effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Soil. Biol. Biochem.* 30:1615-1618.
- Chandler, D., Davidson, G., Grant, W.P., Greaves, J., Tatchell, G.M. (2008). Microbial biopesticides for integrated crop management: an assessment of environmental and regulatory sustainability. *Trends Food Sci. Tech.* 19:275-283.
- Chelius, M.K., Triplett, E.W. (2000). Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumonia* in association with *Zea mays*. *Lett. Appl. Environ. Microbiol.* 66:783-787.
- Chen, C.C., Hsu, S.T., Tzeng, K.C. (1992). Colonization capability of fluorescent pseudomonads in the rhizosphere of tomato. *Plant Pathol. Bull.* 1, 130-139.
- Chen, Z. L., Gu, H. Y. (1993). *Plant biotechnology in China*. Science Washington 262:377-378.
- Compant, S., Clement, C., Sessitsch, A. (2010). 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.
- Costerton J., Geesey, G.G., Chen, K.J. (1978). How bacteria stick. *Sci. Am.* 238: 86-95.
- Croes, S., Weyens, N., Colpaert, J., Vangronsveld, J. (2015). Characterization of the cultivable bacterial populations associated with field grown *Brassica napus* L.: an evaluation of sampling and isolation protocols. *Environ. Microbiol.* 17(7):2379-92.
- da Silva, P., Nahas, E. (2002). Bacterial diversity on soil in response to different plants, phosphate fertilizer and liming. *Brazilian J. Microbiol.* 33:304-310.
- Danhorn, T., Fuqua, C. (2007). Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 61:401-422.
- Davey M., O'Toole, G. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 847-867.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. Greenberg, E.P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* 280:295- 298.



- de Bruijn, F.J. (1992). Use of REP (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2180-2187.
- de Campos, S.B., Youn. J.W., Farina, R., Jaenicke, S., Jünemann, S., Szczepanowski, I.R., Beneduzi, A., Vargas, L.K., Goesmann, A., Wendisch, V.F., Passaglia, L.M.P. (2012). Changes in Root Bacterial Communities Associated to Two Different Development Stages of Canola (*Brassica napus* L. var *oleifera*) Evaluated through Next-Generation Sequencing Technology. *Microb. Ecol.* 65(3):593-601.
- de Freitas, J.R., Gupta, V.V.S.R., Germida, J.J. (1993). Influence of *Pseudomonas syringae* R25 and *P. putida* R105 on the growth and N₂ fixation (acetylene reduction activity) of pea (*Pisum sativum* L.) and field bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Biol. Fertil. Soils* 16:215-220.
- de Freitas, J., Banerjee, M., Germida, J. (1997). Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol. Fertil. Soils.* 24:358-364.
- de Oliveira, A.L.M., de Canuto E.L., Urquiaga, S., Reis V.M., Baldani, J.I. (2006). Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. *Plant Soil.* 284:23-32.
- de Souza, A.A., Takita, M.A., Coletta-Filho, H.D., Caldana, C., Yanai, G.M., Muto, N.H., de Oliveira, R.C., Nunes, L.R. Machado, M.A. (2004). Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation in vitro. *FEMS Microbiol. Lett* 237: 341-353.
- de Weert, S., Vermeiren, H., Mulders, I.H.M., Kuiper, I., Hendrickx, N., Bloemberg, G.V., Vanderleyden, J. (2002). Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15(11):1173-80.
- Degrassi, G., Devescovi, G., Solis, R., Steindler, L., Venturi, V. (2007). *Oryza sativa* rice plants contain molecules that activate different quorum-sensing N-acyl homoserine lactone biosensors and are sensitive to the specific AiiA lactonase. *FEMS Microbiol. Lett.* 269:213-220.
- Dehpouri, F., Vahedi, A., Yasari, E., Chepi, O.G., Haddadi, M.H. (2015). Effects of phosphate solubilizing bacteria and mineral phosphorous levels on yield and yield components of canola Hyola 401 cultivar. *Agric. Adv.* 4:7-14.



- Dekkers, L.C., Bloemendaal C.J.P., de Weger, L. A., Wijffelman, C.A., Spaink, H.P., Lugtenberg, B.J J., De Weger, L.A. (1998). A two-component system plays an important role in the root-colonizing ability of *Pseudomonas fluorescens* strain WCS365. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11, 45-56.
- Dennis, P.G., Miller, A.J., Hirsch, P.R. (2010). Are root exudates more important sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities?. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 72 : 313-327.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada M., Robledo Y.C. (2014). InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Döbereiner, J. (1995). Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil and plants. In "Methods in Applied Soil Microbiology and Biotechnology" (eds. Alef, K. and Nannipieri, P.). Academic Press, London, 134-141.
- Donate-Correa, J., Barrios, M.L., Galdona, R.P. (2004). Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Islands. *Plant Soil.* 266:75-84.
- Dong, Y.H., Xu, J.L., Li, X.Z., Zhang, L.H. (2000). AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:3526-3531.
- Dong, Y.H., Gusti, A.R., Zhang, Q., Xu, J.L., Zhang, L.H. (2002). Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1754-1759
- Donlan, R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infect. Dis.* 8(9):pp:881-890.
- Downie, J.A. (2014). Legume nodulation. *Curr. Biol.* 24(5):184-90
- Eberhard, A., Burlingame, A.L., Eberhard, C., Kenyon, G.L., Nealson, K.H., Oppenheimer, N.J., (1981). Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* 20:2444-2449.
- El-Howeity, M.A., Asfour, M.M. (2012). Response of some varieties of canola plant (*Brassica napus* L.) cultivated in a newly reclaimed desert to plant growth promoting rhizobacteria and mineral nitrogen fertilizer. *Ann. Agric. Sci.* 57(2):129-136.
- El-Habbasha, S.F., Abd El-Salam, M.S. (2010). Response of two canola varieties (*Brassica napus* L.) to nitrogen fertilizer levels and zinc foliar application. *Int. J. Acad. Res.* 2(2):60-66.

- Elasri, M., Delorme, S., Lemanceau, P., Stewart, G., Laue, B. (2001). Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. than among soilborne *Pseudomonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1198-209.
- English, M.M., Coulson, T.J.D., Horsman, S.R., Patten, C.L. (2010). Overexpression of *hns* in the plant growth-promoting bacterium *Enterobacter cloacae* UW5 increases root colonization. *J. App, Microbiol.* 108:2180-90.
- Fageria, N.K. (1992). Biological yield, economic yield and harvest index. In: Fageria, N.K. (Ed.), *Maximizing Crop Yields*. Marcel Dekker, New York, pp. 10-13.
- Fageria, N.K., Stone, L.F. (2006). Physical, chemical, and biological changes in the rhizosphere and nutrient availability. *J. Plant Nutr.* 29:1327-1356.
- Fedorov, D.N., Ivanova, E.G., Doronina, N. V., Trotsenko, Y.A. (2008). A new system of degenerate oligonucleotide primers for detection and amplification of *nifHD* genes. *Microbiology* 77(2):247-249.
- Ferguson, B.J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.H., Lin Y.H., Reid, D.E., Gresshooff, P.M. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J. Integr. Plant Biol.* 52 (1):61-71.
- Flores-Mireles, A.L., Winans, S.C., Holguin, G. (2007). Molecular characterization of diazotrophic and denitrifying bacteria associated with mangrove roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(22):7308-21.
- Forlani, G., Mantelli, M., Branzoni, M., Nielsen, E., Favilli, F. (1995). Differential sensitivity of plant-associated bacteria to sulfonylurea and imidazolinone herbicides. *Plant Soil.* 176:243-253.
- Franco, D. A, Morales S.O. (2006) .Effect of inoculation with *Azospirillum brasillense* and chemical fertilization on canola (*Brassica napus*) growth and yield. *Revista Fitotecnia Mexicana, Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. Chapingo, México* 29: 63-67.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C., Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176:269-275.
- Fuqua, C., Parsek, M.R., Greenberg, E.P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu. Rev. Genet.* 35:439-468.
- Gaby, J.C., Buckley, D.H. (2012). A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the *nifH* gene of nitrogenase. *PloS one* 7:e42149.

- Gavito, M.E., Miller, M.H. (1998a). Changes in mycorrhiza development in maize induced by crop management practices. *Plant Soil*. 198:185-192.
- Gavito, M.E., Miller, M.H. (1998b). Early phosphorus nutrition, mycorrhizae development, dry matter partitioning and yield of maize. *Plant Soil*. 198:177-186.
- Garbeva, P., van Veen, J.A., van Elsas, J.D. (2004). Microbial diversity in soil: selection microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42(29): 243-70.
- Germida, J.J., Siciliano, S.D., de Freitas, J., Seib, A.M.. (1998). Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) *FEMS Microbiol. Ecol* 26: 43-50.
- Ghanbari-Malidarreh, A. (2010). Effects of nitrogen rates and splitting on Oil content and seed yield of canola (*Brassica napus* L.). *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.*, 8 (2):161-166.
- Gholami, A., Shahsavani, S., Nezarat, S. (2009). The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination seedling growth and yield of maize. *World Acad. Sci. Eng. Technol.* 49:19-24.
- Gianinazzi-Pearson, V., Brazanti, B., Gianinazzi, S. (1989). In vitro enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis* 7:243-255.
- Gianinazzi-Pearson, V., Smith, S.E., Gianinazzi S., Smith, F.A. (1991). Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizal. Is H-ATPase a component of ATP-hydrolysing enzyme activities in plant-fungus interfaces?. *New Phytol.* 117:61-64.
- Giovannetti, M., Avio, L., Sbrana, C., Citernesi, A.S. (1993). Factors affecting appressorium development in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus? *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Ger.& Trappe. *New Phytol.* 123:115-122.
- Glick, B.R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41:109-117.
- Goldstein, A.H. (1986). Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *Am. J Altern. Agri.* 1:51-7.
- Gourion, B., Berrabah, F., Ratet, P., Stacey, G. (2014). Rhizobium-legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Trends Plant Sci.* 20(3):186-194.

- Govindarajan, M., Know, S.W., Weon, H.Y. (2007). Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella spp* GR9. *World. J. Microbiol.* 23:997-1006.
- Graham, P. H. (1988). Principles and Application of Soil Microbiology, 322-345.
- Gray, E.J., Smith, D.L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol. Biochem.* 37(3): 395-412.
- Gupta, P., Gupta, V. (2006). Study on efficacy of biofertilizer on yield of wheat (*Triticum aestivum*) and mustard (*Brassica junacea*) *J. Microb. World.* 8:51-56.
- Gualtieri, G., Bisseling, T. (2000). The evolution of nodulation. *Plant Mol. Biol.* 42 181-194.
- Gutiérrez Manero, F.J., Pozuelo González, J.M., Lucas J.A., y Probanza, A. (1995) Effects of nodular extracts of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. on nitrogen fixation (Acetylene reduction assay) and denitrification in different soils. *Orsis* 10. 17-23.
- Gutiérrez Mañero, F.J., Acero, N., Lucas, J.A., Probanza, A. (1996). The influence of native rhizobacteria on European alder (*Alnus glutinosa* L. Gaertn.) growth. II. Characterization and biological assays of metabolites from growth promoting and growth inhibiting bacteria. *Plant Soil.* 182, 67-74.
- Gyaneshwar, P., James, E.K., Mathan, N., Reddy, P.M., Reinhold-Hurek, B., Ladha, J.K. (2001). Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 183:2634-2645.
- Gyaneshwar, P., Naresh, K.G., Parekh, L.J., Poole, P. (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil.* 245:83-93.
- Haas, D. Defago, G. (2005). Biological control of soilborne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:307-319.
- Hall, J.A., Peirson, D., Ghosh, S. y Glick, B.R. (1996). Root elongation in various agronomic crops by the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Isr. J. Plant. Sci.* 44:37-42.
- Hallmann, J., Berg, B. (2007). Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. In: *Microbial root endophytes*. Schulz, B.J.E., Boyle, C.J.C., Sieber, T.N. (eds) Springer, Berlin, PP15-31.
- Hameeda, B., Harini, G., Rupela, O. P., Wani, S. P., & Reddy, G. (2008). Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiol. Res.* 163(2):234-242.

- Hamon, M.A., B.A. Lazazzera (2001). The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis* Mol. Microbiol. 42:1199-1209.
- Han, J., Sun, L., Dong, X., Cai, Z., Yang, H., Wang, Y., Song, W. (2005). Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various pathogens. Syst Appl Microbiol 28:66-76.
- Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., Van Elsas, J.D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. Trends Microbiol. 16(10): 463-71
- Hartmann, A., Schmid, M., van Tuinen, D., Berg, G. (2009). Plantdriven selection of microbes. Plant Soil. 321: 235-257.
- Hasanalideh, A. H., Hojati, M. (2012). Enhancing yield and nitrogen use efficiency of *Brassica Napus* L. using an integrated fertilizer management. Adv. Environ. Biol. 6(2):641-647.
- Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T.B. (2002). Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. Microbiol. 148:87-102.
- Hepper, C.M. (1981). Techniques for studying the infections of plants by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under axenic conditions. New Phytol. 88:641-647.
- Hinsä, S.M., Espinosa-Urgel, M., Ramos, J.L., O'toole, G.A. (2003). Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* requires an ABC transporter and a large secreted protein. Mol. Microbiol. 49:905-918.
- Hoagland, D. R., Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. Univ. California Agric. Exper. Sta. Cir. 347.
- Holloway, B. W. (1955). Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Gen. Microbiol. 13:572-581.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology. 9.ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 787p.
- Hurek, T., Reinhold-Hurek, B. (2005). Molecular ecology of N₂-fixing microbes associated with gramineous plants: hidden activities of unknown bacteria. In Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment (pp. 173-198). Springer Netherlands.

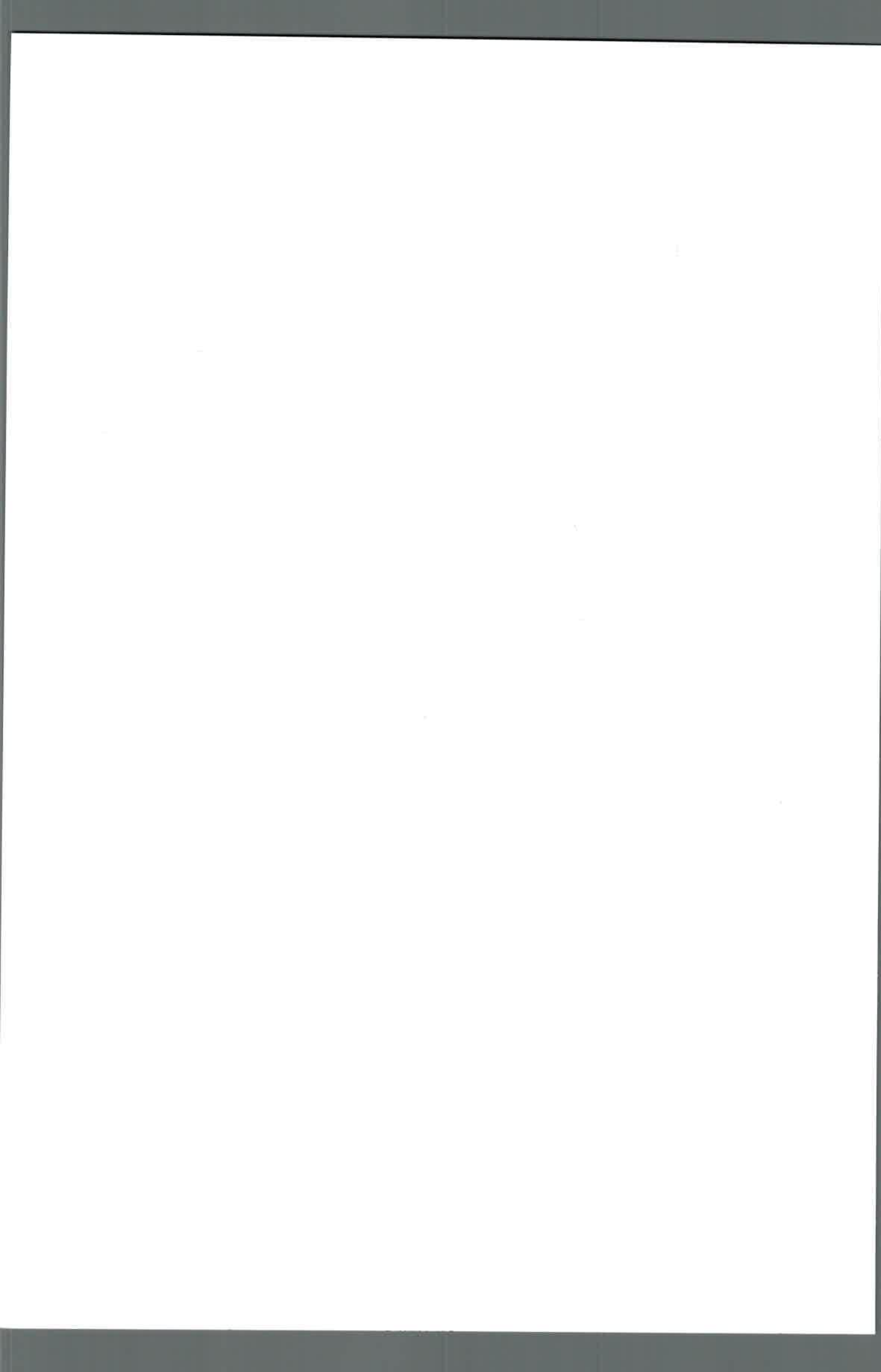
- Ibáñez, F., Angelini, J., Taurian, T., Tonelli, M.L., A. Fabra. (2009). Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic Gammaproteobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 32(1):49-55.
- Idriss, E.E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H., Richter, T., Borris, R. (2002). Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant.growth promoting effect. *Microbiol.* 148:2097-2109.
- Iniguez, A.L., Dong, Y., Triplett, E.W. (2004). Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 17:1078-1085.
- Iriarte, L., Valetti, O., Appella, C. (2007). Development of culture of colza (*Brassica napus*) in Argentina. Proceedings of the 12 th. International rapeseed Congress. Wuhan, China.
- Iriarte, L., O. Valetti. (2008). En "Cultivo de Colza" 1ª edición. C.A. Bs. As. INTA .
- Iriarte, L., Lopez, Z. (2014). Anales 1er simposio latinoamericano de canola. Passo Fundo. Brasil.
- Ivanova, R., Bojinova, D., y Nedialkova, K. (2006). Rock phosphate solubilization by soil bacteria. *J. University of Chemical Technology and Metallurgy.* 41:297-302.
- Jolicoeur, M., Germette, S., Gaudette, M., Perrier, M., Bécard, G., (1998). Intracellular pH in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiol.* 116:1279-1288.
- Jorquera, M.A., Hernández, M.T., Rengel, Z., Marschner, P., Mora, M.L. (2008). Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. *Biol. Fertil. Soils.* 44:1025-1034.
- Kaiser, D., Losick, R. (1993). How and why bacteria talk to each other. *Cell* 73: 873-885.
- Karthikeyan, M., Bhaskaran, R., Radhika, K., Mathiyazhagan, S., Jayakumar, V., Sandoskumar, R., Velazhahan, R. (2005). Endophytic *Pseudomonas fluorescens* Endo2 and Endo35 induce resistance in black gram (*Vigna mungo* L. Hepper) to the pathogen *Macrophomina phaseolina*. *J. Plant. Interact.* 1:135-143.
- Karthikeyan, N., Prasanna, R., Nain, L., Kaushik, B.D. (2007). Evaluating the potential of plant growth promoting cyanobacteria as inoculants for wheat. *Eur. J. Soil Biol.* 43: 23-30.

- Keivanrad, S., Delkosh, B., Shirani Rad, A.H., Zandi, P. (2012). The effect of different rates of nitrogen and plant density on qualitative and quantitative traits of Indian mustard. *Adv. Environ. Biol.* 6(1):145-152.
- Keshavan, N.D., Chowdhary, P.K., Haines, D.C., González, J.E. (2005). L-Canavanine made by *Medicago sativa* interferes with quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 187:8427-8436.
- Kloepper, J.W., Hume, D.J., Scher, F.M., Singleton, C., Tipping, B., Laliberté, M., Frauley, K., Kutchaw, T., Simonson, C., Lifshitz, R., Zaleska, I., Lee L. (1988). Plant growth-promoting rhizobacteria on canola (rapeseed). *Plant Dis.* 72:42-46.
- Kloepper, J.W., Lifshitz R., Zablotowicz, R.M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7:39-49.
- Kloepper, J. W., Tuzun, S., Zehnder, G.W., Wei, G. (1997). Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance - historical precedence. *Phytopathology.* 87:136-137.
- Kuklinsky-Sobral, J., Araújo, W., Mendes, R., Geraldi, I., Pizzirani-Kleiner, A., Azevedo, J. (2004). Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ. Microbiol.* 6:1244-1251.
- Kumar, R., Bhatia, R., Kukreja, K., Behl, R. K., Dudeja, S. S., Narula, N. (2007). Establishment of *Azotobacter* on plant roots: chemotactic response, development and analysis of root exudates of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Basic Microbiol.* 47(5), 436-439.
- Lacava, P.T., Araújo, W.L., Marcon, J., Maccheroni, W.Jr, Azevedo, J.L. (2004). Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. *Lett Appl Microbiol* 39:55-59
- Lasa, I., del Pozo, J.L. y Penadés, J.R. (2005). Biofilms Bacterianos e infección. Gobierno de Navarra. Departamento de Salud. 28(2):163-175.
- Lee, S. J., Park, S.Y., Lee, J.J., Yum, D.Y, Koo, B.T., Lee, J.K.. (2002). Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3919-3924.
- Leite, B., Ishida, M.L., Alves, E., Carrer, H., Pascholati, S.F., Kitajima, E.W. (2002). Genomic and X- ray microanalysis indicate that Ca^{2+} and thiols mediate the

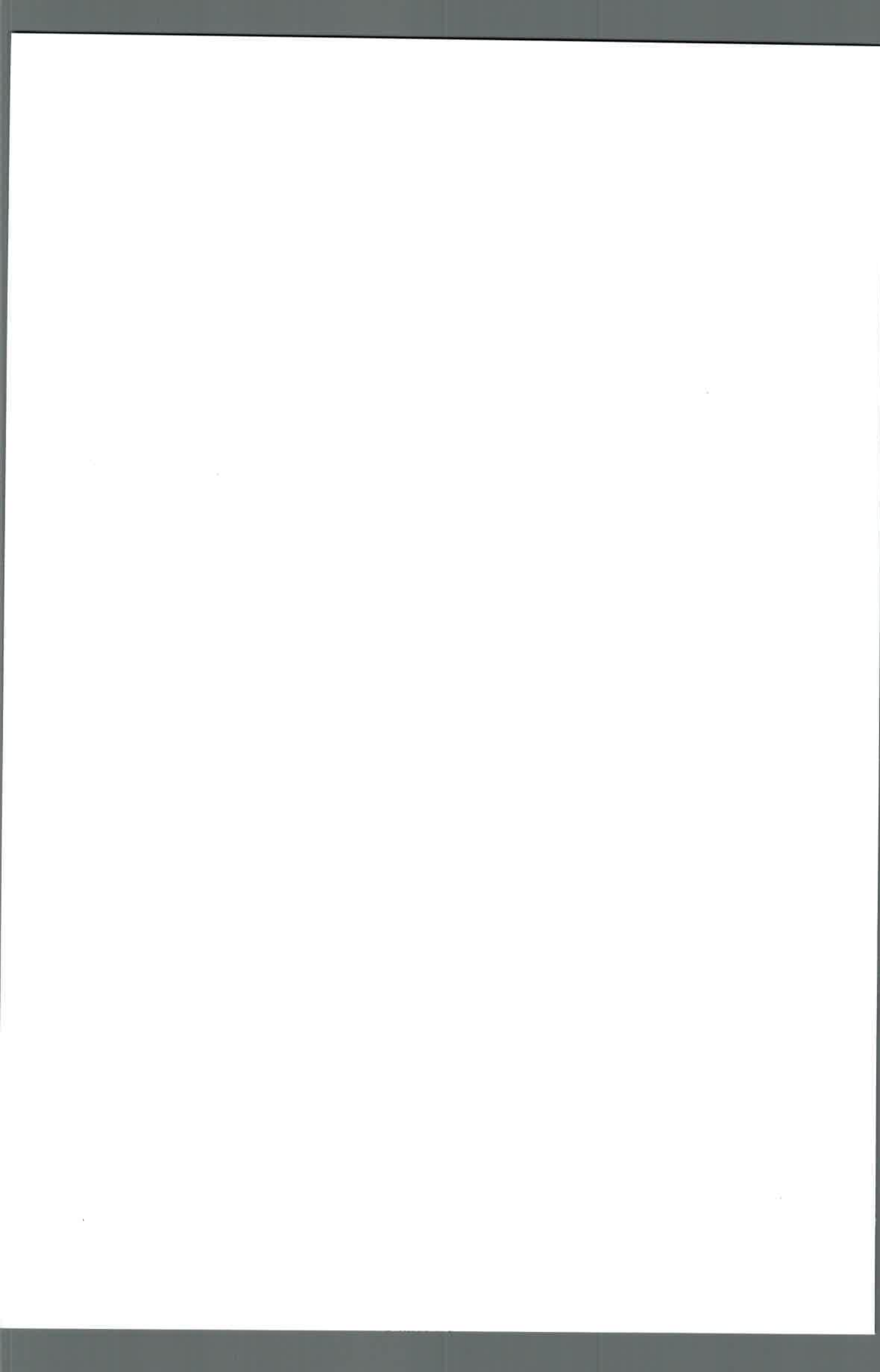
- aggregation and adhesion of *Xylella fastidiosa*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35:645-650.
- Lemanceau, P., Alabouvette, C., (1993). Suppression of *Fusarium* wilts by fluorescent pseudomonads: mechanisms and applications. *Biocontr. Sci. Tech.*, 3:219-234.
 - Li, Y.H., Tang, N., Aspiras, M.B., Lau, P.C. Y., Lee, J.H., Ellen, R.P., Cvitkovitch, D. G. (2002). JA Quorum-Sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *Bacteriol.* 184:2699- 2708.
 - Liba, C. M., Ferrara F., Manfio, G., Fantinatti-Garboggini, F., Albuquerque, R., Pavan, C., Ramos, P., Moreira-Filho, C., Barbosa, H. (2006). Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria- deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. *J. App. Microbiol.* 101:1076-1086.
 - Lifshitz, R., Kloepper, J.W., Kozlowsky, M., Simonson, C., Tipping, E.M., Zaleska, I. (1987). Growth promotion in canola (rapeseed) seedings by strain of *Pseudomona putida* under gnototropic condition. *Can. J. Microbiol.* 23:390-395.
 - Liu, Z.L., Sinclair J.B. (1993). Colonization of soybean roots by *Bacillus megaterium* B153-2-2. *Soil. Biol. Biochem.* 25:849-855.
 - Liu, L., Kloepper, J.W., Tuzun, S. (1995). Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology* 85:1064-1068.
 - Lucas García, J., Probanza, A., Ramos, B., Barrientos, M., Gutierrez-Mañero. (2001). Genetic variability of rhizobacteria from wild populations of four *Lupinus* species based on PCR-RAPDs. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 164:1-7.
 - Lugtenberg, B.J.J., Kravchenko L.V. Simons, M. (1999). Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. *Environ. Microbiol.* 1:439-446.
 - Lugtenberg, B.J.J., Chin-A-Woeng T.F.C., Bloemberg, G.V. (2002). Microbe-plant interaction: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 81:373-383.
 - Lynch, J.M., Whipps, J. M. (1990). Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil.* 129:1-10.

- Madani, H., Malboobi, M.A., Stoklosa, A. (2011). Biological and Chemical Phosphorus Fertilizers Effect on Yield and P Accumulation in Rapeseed (*Brassica napus* L.). Not. Bot. Horti. Agrobo. 40:210-214.
- Mano, H., Morisaki, H. (2008). Endophytic bacteria in rice plant. Microbes Environ. 23:109-117.
- Marketon, M.M., Glenn, S.A., Eberhard, A., Gonzalez, J.E. (2003). Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 185:325-331.
- Mathesius, U., Mulders, S., Gao, M., Teplitski, M., Caetano-Anolles, G., Rolfe, B.G., Bauer, W.D. (2003). Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:1444-1449.
- Matthyse, A.G., McMahan, S. (2001). The effect of the *Agrobacterium tumefaciens* on attachment and root colonization differs between legums and other dicots. Appl. Environ. Microbiol. 67:1070-1075.
- McClean, K.H., Wilson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A., Williams, P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. Microbiology. 143:3003-3011.
- Megawer, E.A., Mahfouz, S.A. (2010). Response of canola (*Brassica napus* L.) to bio-fertilizers under Egyptian conditions in newly reclaimed soil. Inter. J. Agric. Sci. 2(1):12-17.
- Mehrvarz, S., Chaichi, M.R., Alikhani, H.A. (2008). Effects of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus chemical fertilizer on yield and yield components of Barely (*Hordeum vulgare* L.). Am-Euras. J. Agric. Environ. Sci. 3:822-828.
- Meighen, E.A. (1994). Genetics of bacterial bioluminescence. Annu. Rev. Genet. 28:117-139.
- Miller, M.B., Bassler, B.L. (2001). Quorum sensing in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 55:165-199.
- Miller, J.H. (1992). A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mohammadi, K., Rokhzadi, A. (2012). An integrated fertilization system of canola (*Brassica napus* L.) production under different crop rotations. Ind. Crops Prod. 37(1):264-269.

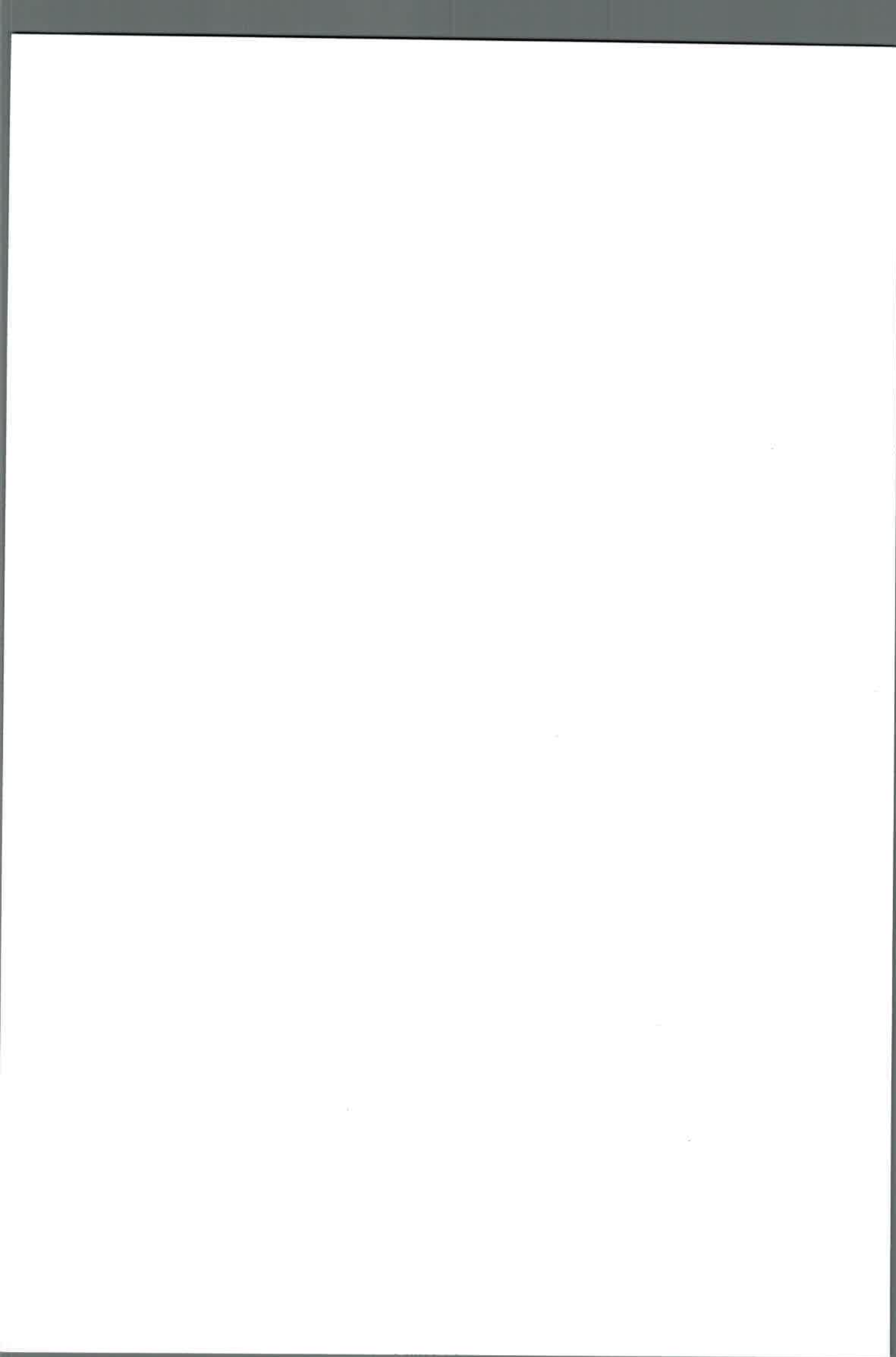
- Molina, M.A., Ramos, J.L., Espinosa-Urgel, M. (2003). Plant-associated biofilms. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2:99-108.
- Montañez, A., Rodríguez Blanco, A., Barlocco, C., Beracochea, M., Sicardi, M., (2012). Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. *Appl. Soil Ecol.* 58:21-28.
- Morris, P.F., Bone, E., Tyler, B.M. (1998). Chemotropic and contact responses of *Phytophthora sojae* hyphae to soybean isoflavonoids and artificial substrates. *Plant Physiol.* 117:1171-78.
- Muñoz-Rojas, J., Caballero-Mellado, J. (2003). Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. *Microb. Ecol.* 46:454-464.
- Muthukumarasamy, R., Revathi, G., Lakshminarasimhan, C. (1999) Diazotrophic associations in sugarcane cultivation in South. India. *Trop. Agric.* 76:171-178.
- Naderifar, M., Daneshian, J. (2012 a). Effect of different nitrogen and biofertilizers effect on growth and yield of *Brassica napus* L. *Intl. J. Agr. Crop Sci.* 4(8):478-482.
- Naderifar, M., Daneshian, J. (2012 b). Effect of seed inoculation with *Azotobacter* and *Azospirillum* and different nitrogen levels on yield and yield components of canola (*Brassica napus* L.) *Iranian J. Plant Physiol.* 3(1):619 - 626.
- Nagahashi, G., Douds, D.D.Jr. (2003). Action spectrum for the induction of hyphal branches of an arbuscular mycorrhizal fungus: exposure sites versus branching sites. *Mycol. Res.* 107:1075-82.
- Narula, N., Kothe, E., Behl, R. K. (2009). Role of root exudates in plant-microbe interactions, *J. Appl. Bot. Food Qual.* 122-130.
- Nautiyal, C.S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms, *FEMS Microbiol. Lett.* 170:265-270.
- Navala, A.A., Wani, P.P., y Patil, A.S. (2004). Effects of VAM and *Azospirillum* inoculation to on onion (*Allium cepa*) cv. B-780 with respect to N, P and micronutrient uptake. *The Orissa J. Hort.* 32:83-88.
- Neumann, E., George, E. (2004). Colonisation with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) enhanced phosphorus uptake from dry soil in *Sorghum bicolor* (L.). *Plant Soil*, 261(1-2):245-255.
- Ohtani, K., Hayashi, H., Shimizu, T., (2002). The luxS gene is involved in cell cell signalling for toxin production in *Clostridium perfringens*. *Mol. Microbiol.* 44: 171-179.



- Okon, Y., Labandera-Gonzalez, C.A., (1994). Agronomic applications of *Azospirillum*. In Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Adelaide, Australia, Edited by Ryder MH, Stephens PM, Bowen GD, 274-278.
- Orlovius, K. (2003). Oilseed rape. en: Kirbky, E.A. (ed.). Fertilizing for High Yield and Quality, IPI Bulletin, Basel, 16, p.125.
- Pal, S. (1998). Interactions of an acid tolerant strain of phosphate solubilizing bacteria with a few acid tolerant crops. Plant Soil. 198:169-177.
- Pal, K.K., Tilak, K.V.B.R., Saxena, A.K., Dey, R., Singh, C.S. (2001). Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. Microbiol Res 156:209-223.
- Peix Rivas-Boyero M.,A., Rodríguez-Barrueco, C., Martínez-Molina, E., Velázquez, E. (2001). Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. Soil Biol. Biochem. 33:103-110.
- Pellerin, S., Mollier, A., Morel, C., Plenchette, C. (2007). Effect of incorporation of *Brassica napus* L. residues in soils on mycorrhizal fungus colonisation of roots and phosphorus uptake by maize (*Zea mays* L.). Eur. J. Agron. 26:113-120
- Pérez-Montaña, F., Jiménez-Guerrero, I., Contreras Sánchez-Matamoros, R., López-Baena, F. J., Ollero, F. J., Rodríguez-Carvajal, M. a., Bellogín, R. a., et al. (2013). Rice and bean AHL-mimic quorum-sensing signals specifically interfere with the capacity to form biofilms by plant-associated bacteria. Res. Microbiol. 164(7):749-760.
- Poly, F., Monrozier, L., Bally R. (2001). Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. Res. Microbiol. 152:95-103.
- Probanza, A., Lucas, J. A., Acero, N., Gutierrez Mañero F.J. (1996). The influence of native rhizobacteria on european alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) growth. Plant Soil.182:59-66.
- Probanza, A., Acero, N., Ramos, B., Gutierrez Mañero, F. (1997). Effects of european alder (*Alnus glutinosa* L. Gaertn) rhizobacteria on nodular metabolism and root development. Pl. Growth Reg. 22:145-149.
- Quiñones, B., Dulla, G., Lindow, S.E. (2005). Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. Mol. Plant Microbe. Interact. 18:682-693.

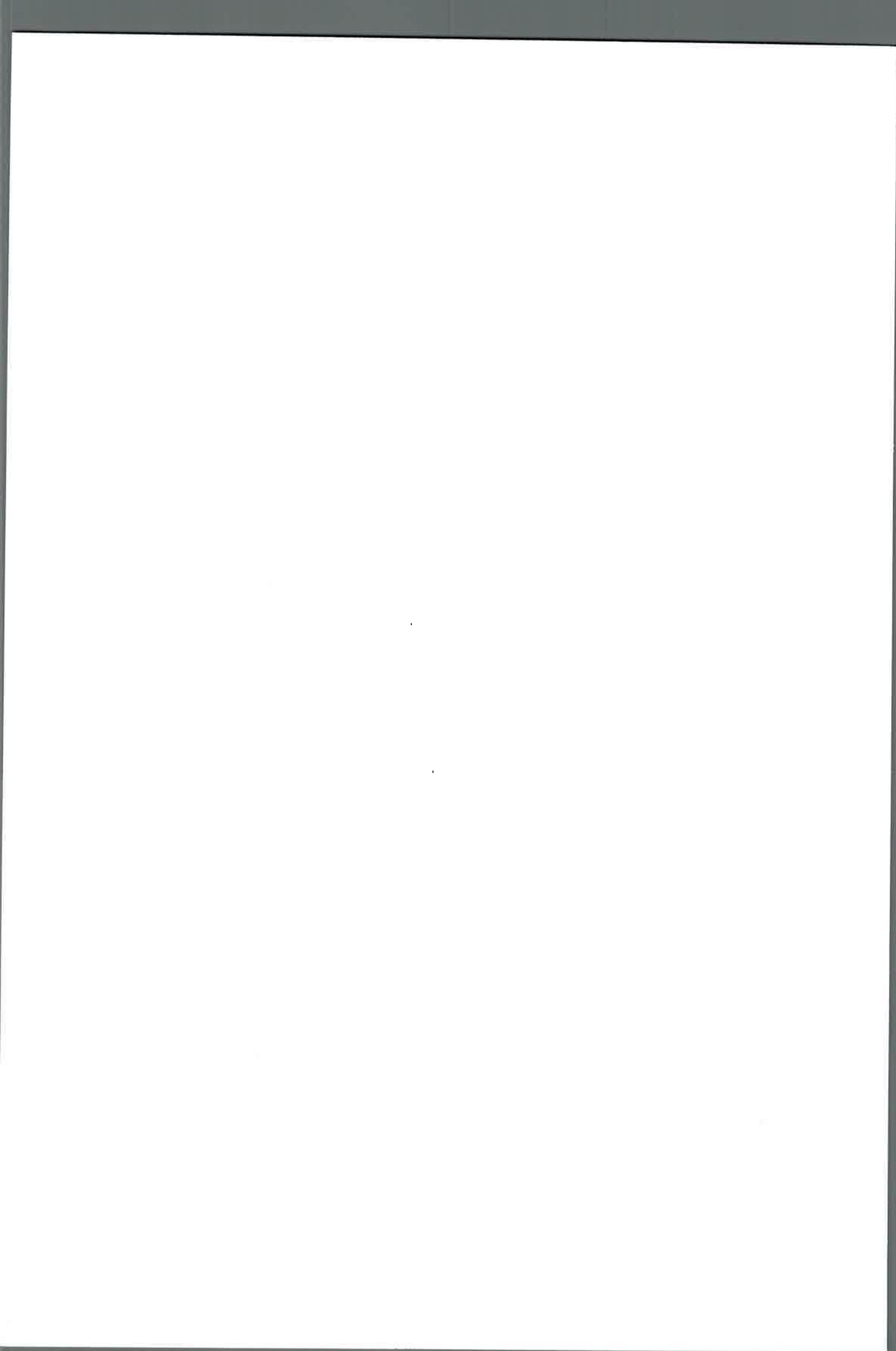


- Rai, S.N., Caur, A.C. (1988). Characterization of *Azotobacter sp.* and effects of *Azospirillum lipoferum* on the yield and N-uptake of wheat crop. *Plant Soil*. 109:131-134.
- Raghotama, K.J. (1999). Phosphate acquisition. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:665-693.
- Rai, S.N., Caur, A.C. (1988). Characterization of *Azotobacter sp.* and effects of *Azospirillum lipoferum* on the yield and N-uptake of wheat crop. *Plant Soil*. 109:131-134.
- Ramey, B. E., Koutsoudis, M., Von Bodman, S. B., & Fuqua, C. (2004). Biofilm formation in plant-microbe associations. *Curr. opin. Microbiol.* 7(6):602-9.
- Reinhold, B., Hurek, T., Niemann, E.G., Fendrik, I. (1986). Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zones of Kallar grass. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:520-526.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T. (2011). Living inside plants: bacterial endophytes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14:435-443.
- Ren, D., Sims, J.J., Wood, T.K. (2001). Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Environ. Microbiol.* 3(11):731-736.
- Renwick, A.R., Campbell, A., Coe, S. (1991). Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Physiol* 40:524-532.
- Requena, N., E. Pérez-Solís, C. Azcón-Aguilar, P. Jeffries, J.M. Barea. (2001). Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:495-498.
- Rice, S.A., Koh, K.S., Queck, S.Y., Labbate, M., Lam, K.W., Kjelleberg, S. (2005). Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. *J. Bacteriol.* 187:3477-3485.
- Richardson, A. E. (2001). Prospect for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 28:897-906.
- Riggs, P.J, Chelius, M.K, Iniguez, A.L, Kaeppeler, S.M., Triplett, E.W. (2001). Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Aust. J. Plant Physiol.* 28:829-836.
- Rinaudi, L.V., Giordano, W., (2010). An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS Microbiol. Lett.* 304:1-11.

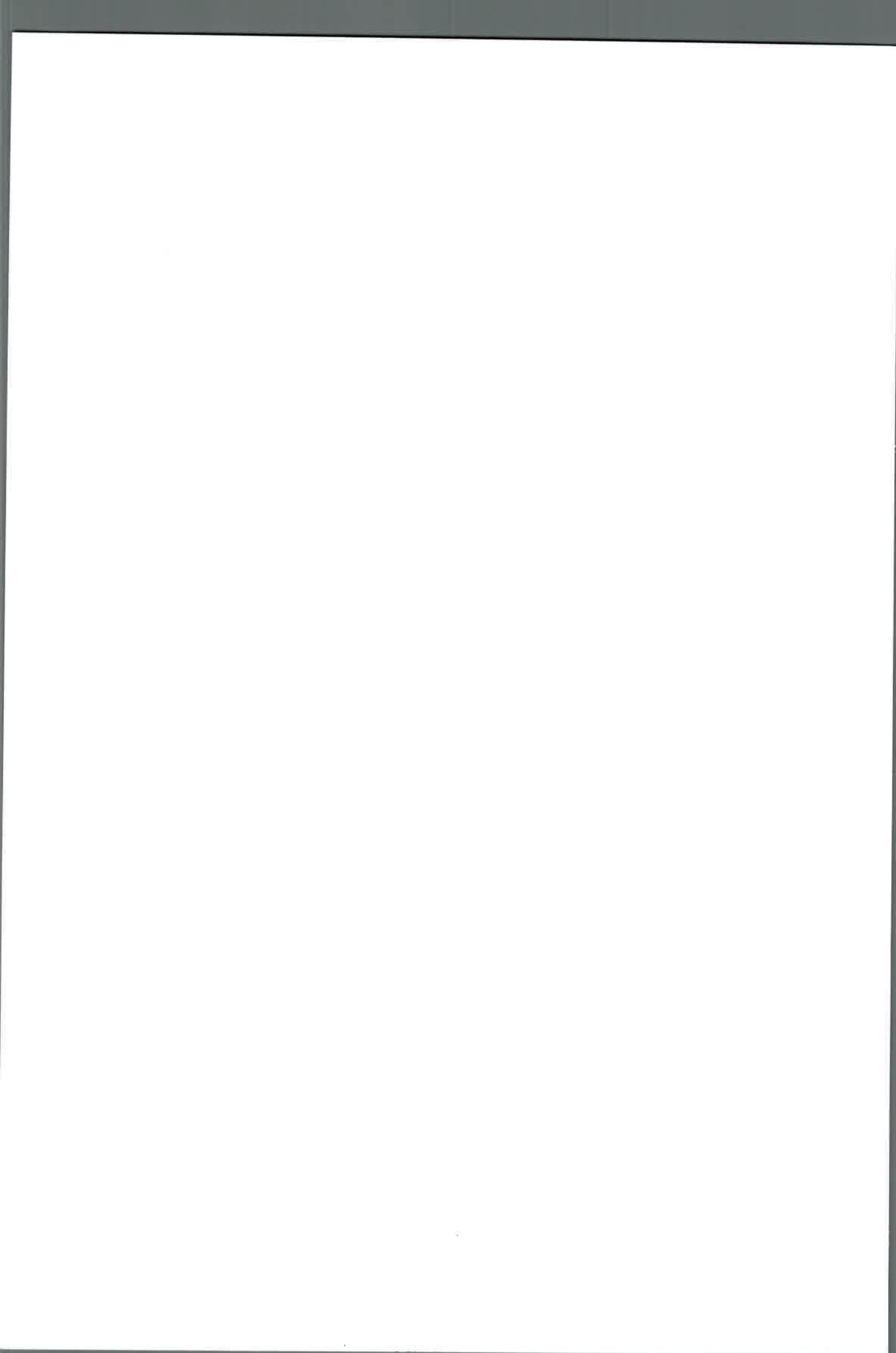


- Rivas, R., Peix, A., Mateos, P. F., Trujillo, M. E., Martínez-Molina, E., Velázquez, E. (2007). Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulates chickpea in different Spanish soils. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization, 23-33.
- Rodríguez, H., Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17:319-339.
- Rodríguez, H., Fraga, R., González, T., Bashan, Y. (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil.* 287:15-21.
- Roesch, L.F.W., Camargo, F.A.O., Bento, F.M., Triplett, E.W. (2007). Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. *Plant Soil.* 302:91-104.
- Rossolini, G., Schippa, S., Riccio, M., Berlutti, F., Macaskie, L., Thaller, M. (1998). Bacterial nonspecific acid phosphohydrolases: physiology, evolution and use as tools in microbial biotechnology. *Cell. Mol. Life Sci.* 54:833-850.
- Rouatt, J.W., Katznelson, H. (1961). A study of the bacteria on the root surface and in the rhizosphere soil of crop plants. *J. Appl. Bacteriol.* 24:164-171.
- Rubio, L.M., Ludden, P.W. (2002). The gene products of the *nif* regulon. In: Leigh GJ, editor. *Nitrogen fixation at the millennium*. Elsevier Science B.V. 101-136
- Ruiz-Herrera, J., Leon-Ramírez, C., Vera, A., Sánchez-Arreguín, A., Ruiz-Medrano, R., Peña-Cabriales, J. (2015). A novel intracellular nitrogen-fixing symbiosis made by *Ustilago maydis* and *Bacillus* spp. *New Phytol.* 207(3):769-777.
- Rumberger, A., Marschner, P. (2004) 2-Phenylethylisothiocyanate concentration and bacterial community composition in the rhizosphere of field-grown canola. *Funct. Plant Biol.* 31:623-631.
- Sagordoy, M.A., Salerno, C.M., (1983). Number, distribution, and characterization of heterotrophic bacteria in some Argentine soils. *An. Edafol. Agrobiol.* 42:2069-2081.
- Saleh, S.A., Mekhemar, G.A.A., El-Sound, A.A.A., Ragab, A.A., Mikhaeel, F.T. (2001). Survival of *Azorhizobium* and *Azospirillum* in different carrier materials : inoculation of wheat and *Sesbania rastrata*. *Bulletin of Faculty of Agriculture, Cairo University* 52:319-338.
- Saikia, S.P., Jain, V. (2007). Biological nitrogen fixation with non-legumes: an achievable target or a dogma? *Current Science* 92: 317-322.

- Salimpour, S., Khavazi, K., Nadlan, H., Besharati, H., Miransari, M. (2010). Enhancing phosphorous availability to canola (*Brassica napus L.*) using P solubilizing and sulfur oxidizing bacteria. *Aust. J. Crop. Sci.* 4(5), 330-334.
- Santi, C., Bogusz, D., Franche, C. (2013). Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Ann. Bot.* 111(5):743-67.
- Santi Ferrara, F.I., Oliveira, Z.M., Gonzales, H.H.S., Floh, E.I.S., Barbosa, H.R. (2011). Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. *Plant Soil.* 353(1-2):409-417.
- Schachtman, D.P., Reid, R.J., Ayling, S.M. (1998). Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol.* 116:447-453.
- Schippers, B., Scheffer, R.J., Lugtenberg, B.J.J., Weisbeek, P.J. (1995). Biocoat of seeds with plant growth-promoting rhizobacteria to improve plant establishment. *Outlook on Agric.* 24:179-185.
- Schreiner, R.P., Koide, R.T. (1993a). Antifungal compounds from the roots of mycotrophic and non-mycotrophic plant species. *New Phytol.* 123:99-105.
- Schreiner, R.P., Koide, R.T. (1993b). Mustards, mustard oils and mycorrhizas. *New Phytol.* 123:107-113
- Sessitsch, A., Howienson, J.G., Perret, X., Aunton, H., Martinez-Romero, E. (2002). Advances in Rhizobium Research. *Crit. Rev. Plant Sci* 4:323-378.
- Sharma, S.K., Mohan Rao, R, y Singh, D.P. (1997). Effects of crop geometry and nitrogen on quality and oil yield of *Brassica* species. *Ind. J. Agron.* 42:357-360.
- Shaukat, K., Affrasayab, S., Hasnain, S. (2006). Growth responses of *Helianthus annuus* to plant growth promoting rhizobacteria used as a biofertilizer. *J. Agri. Res.* 1(6):573-581.
- Sheng, X., Chen, X., He, L. (2008). Characteristics of an endophytic pyrene-degrading bacterium of *Enterobacter* sp. 12 J1 from *Allium macrostemon* Bunge. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 62:88-95.
- Shi, Y., Wang, Y., Zhou, Q., Liu, H., Li, B., Luo, J., Xie, G., et al. (2012). Effect of rice root exudates and strain combination on biofilm formation of *Paenibacillus polymyxa* and *Paenibacillus macerans*, *Afr. J. Microbiol. Res.* Vol. 6(13), 3343-3347.
- Siciliano, S.D. y Germida, J.J. (1999). Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the non-transgenic *B. Napus* cv. Exel and *B. Rapa* cv. Parkland. *FEMS Microbiol. Eco.* 29:263-372.



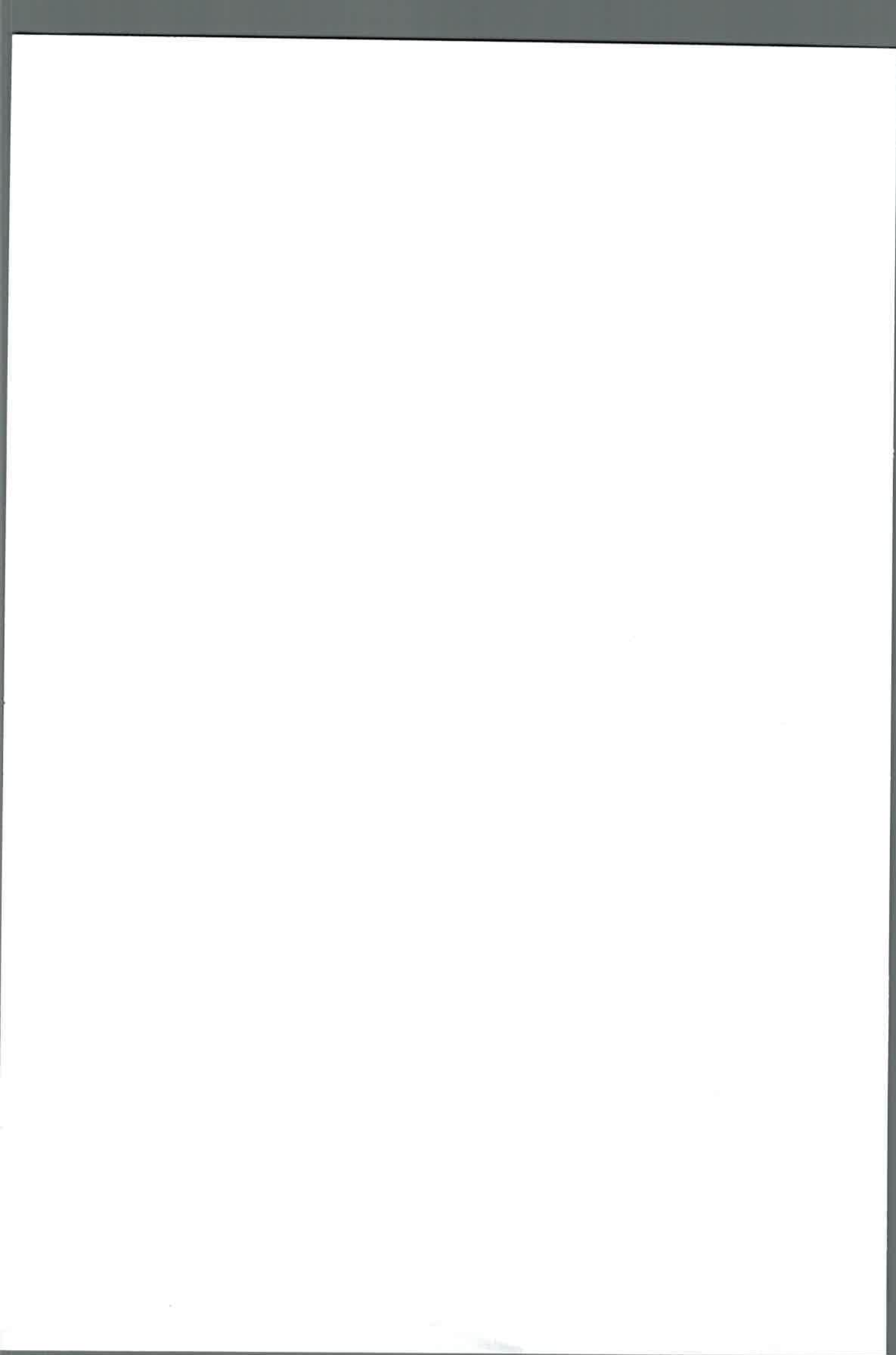
- Simões, M., L.C. Simões, and M.J. Vieira. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Sci. Technol.* 43(4): 573-583 .
- Singh P., Bhargava, S. C. (1994). Changes in growth and yield components of *Brassica napus* in response to *Azotobacter* inoculation at different rates of nitrogen application. *J. Agric. Sci.* 122: 241-247.
- Singh, S., Kapoor, K.K. (1999). Inoculation with phosphate-solubilizing microorganisms and a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in a sandy soil. *Biol. Fertil. Soils.* 28:139-144.
- Singh, M.M., Mautya, M.L., Singh, S.P. y Mishra, C.H. (2005). Effects of nitrogen and biofertilizers inoculation on productivity of forage sorghum (*Sorghum bicolor*). *Ind J. Agric. Sci.* 73:167-168.
- Smith, S.E., Gianninazzi-Pearson, V., (1988). Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* 39:221-244.
- Smith, S.E., Read, D.J. (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*. 2da Edición Academic Press, Cambridge, 605 pp.
- Somasegaran, P., Hoben, H.J. (1994). *Handbook for rhizobia: Methods in legume-rhizobium technology*.
- Somers, E., Vanderleyden, J., Srinivasan, M. (2004). Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol.* 304: 205-240.
- Son, H.J., Park, G.T., Cha, M.S., Heo, M.S. (2006). Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and Ph tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresour. Technol.* 97:204-210
- Spaink, H.P. (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria . *Annu. Rev. Microbiol.* 54:387-392.
- Sprent, J., Sprent, P. (1990). *Nitrogen fixing organisms. Pure and applied aspects*. London. Chapman and Hall. 256 p.
- Stanley, N.R., Lazazzera, B.A. (2004). Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 52: 917-924
- Stevens ,A.M., Dolan, K.M., Greenberg, E.P. (1994). Synergistic binding of the *Vibrio ? scheri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the lux promoter region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12619-23.
- Stolfus, J.R., So, R., Malarvithi, P.P., Ladha, J.K., Bruijn, F.J. (1997). Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. *Plant Soil.* 194:25-36.



- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:187-209.
- Sundara, B., Natarajan, V., Hari, K. (2002). Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane yields. *Field Crops Res.* 77:43-49.
- Taheri, E., Soleymani, A., Javanmard, H. R. (2012). The effect of different Nitrogen Levels on oil yield and harvest index of two spring rapeseed cultivars in Isfahan region. *Intl. J. Agric. Crop Sci.* 4(20):1496-1498.
- Tahir, M., Sarwar, M. A. (2013). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Budding Complement of Synthetic Fertilizers for Improving Crop Production. *Pak. j. Life Soc. Sci.* 11(1):1-7.
- Taiz, L., Zeiger, E. (1991). Plant and cell architecture. En *Plant Physiology* (The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., California), pp. 3-27.
- Tamasloukht, M., Sejalon-Delmas, N., Kluever, A., Jauneau, A., Roux, C., Bécard, G. (2003). Root factors induce mitochondrial-related gene expression and fungal respiration during the developmental switch from asymbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Plant Physiol.* 131: 1468-1478.
- Tan, S., Yang, C., Mei, X., Shen, S., Raza, W., Shen, Q., Xu, Y. (2013). The effect of organic acids from tomato root exudates on rhizosphere colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* T-5. *Appl. Soil Ecol.* 64:15-22.
- Taurian, T., Anzuay, M.S., Angelini, J.G., Tonelli, M.L., Ludueña, L., Pena, D., Ibáñez, F., Fabra, A. (2010). Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. *Plant Soil.* 329:421-431.
- Teplistki, M., Robinson, J.B., Bauer, W.D. (2000). Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density dependent behaviors in associated bacteria. *Mol. Plant Microbe Int.* 13:637-648.
- Ticconi, C.A., Abel, S. (2004). Short on Phosphate: plant surveillance and countermeasures. *Trends Plant Sci.* 9:548-555.
- Vale Barreto Figueiredo M., Seldin, L., de Araujo, F.F., de Lima Ramos Mariana R. (2010). Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications. In: Maheshwari DK. ed. *Plant growth and health promoting bacteria*. Microbiol. Monographs No. 18. Berlin: Springer Verlag, 21-43.

- Vanbleu, E., Vanderleyden, J. (2007). Molecular genetics of rhizosphere and plant-root colonization. In: Elmerich, C., Newton, W.E. eds. Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 85-112.
- Vance, C. (2001). Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiol.* 127: 390-397.
- Vandenberghe C., Bachelart F., Benoit J., Marcoen J.M., (2010). Fertilisation azotée du colza : évaluation de la réglette « azote colza » dans les parcelles du Survey Surfaces Agricoles et essais dans le cadre d'un centre régional de référence et d'expérimentation. Dossier GRENeRA 10-03, 24p.
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G.F., Chater, K.F., van Sinderen, D. (2007). Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71(3):495-548 .
- Verma, S.C., Ladha, J.K., Tripathi, A.K. (2001). Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J. Biotechnol.* 91:127-141.
- Vessey, J.K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizer. *Plant Soil.* 255:571-586.
- Vierheilig, H., Ocampo, J.A. (1990). Effect of isothiocyanates on germination of spores of *G. Mosseae*. *Soil Biol. Biochem.* 22:1161-1162.
- Vincent, J.M. (1970). A manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific, Oxford.
- Wakelin, S. A., Warren, R. A., Harvey, P. R., Ryder, M. H. (2004). Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. *Biol. Fert. Soils*, 40(1):36-43.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material, *BioTechniques* 10:506-513.
- Walker, T.S., Bais, H.P., D'eziel, E., Schweizer, H.P., Rahme, L.G., Fall, R. Vivanco, J.M. (2004). *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant. Physiol.* 134:320-331.
- Webb, J.S., Givskov, M., Kjelleberg, S. (2003). Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. *Curr. Opin. Microbiol.*, 6(6):578-585.

- Widmer, D., Shaffer, B., Porteous, L., Seidler, R. (1999). Analysis of nifH gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon cascade mountain range. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:374-380.
- Whitehead, N.A., Barnard, A.M., Slater, H., Simpson, N.J., Salmond, G.P. (2001). Quorum sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25:365-404.
- Xie, X., Yoneyama, K., Yoneyama, K. (2010). The strigolactone story. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48:93-117A.
- Yanni, Y.G., Rizk, R.Y., Corich, V., Squartini, A., Ninke, K., Philip-Hollingsworth, S., Orgambide, G., de Bruijn, F.D., Stoltzfus, J., Buckley, D., Schmidt, T.M., Mateos, P.F., Ladha, J.K., Dazzo, F.B., (1997). Natural endophytic associations between *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant Soil.* 194:99-114.
- Yasari, E., Patwardham, A. (2007). Effects of (*Azotobacter* and *Azospirillum*) Inoculants and Chemical Fertilizers on Growth and Productivity of Canola (*Brassica napus* L.) *Asian J. Plant Sci.* 6:77-82.
- Yazdani, M., Bahmanyar, M.A., Pirdashti, H., Esmaili, M.A. (2009). Effect of phosphate solubilisation microorganisms (PSM) and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components of Corn (*Zea mays* L.). *Proc. World Acad. Sci. Eng. Technol.* 37:90-92.
- Zaidi, A., Khan, M.S., Amil, M. (2003). Interactive effect of rhizotrophic microorganisms on yield and nutrient uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Eur. J. Agron.* 19:15-21.
- Zaidi, A., Khan, M.S. (2006). Co-inoculation effects of phosphate solubilizing microorganisms and *Glomus fasciculatum* on green gram-*Bradyrhizobium* symbiosis. *Turk. J. Agric.* 30:223-230.
- Zhang, L.H., Dong, Y.H. (2004). Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Mol. Microbiol.* 53:1563-1571.
- Zheng, X.Y., Sinclair, J.B. (1996). Chemotactic response of *Bacillus megaterium* strain B153-2-2 to soybean root and seed exudates *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 48:21-35.
- Zehr, J.P., Mellon, M.T., Zani, S. (1998). New Nitrogen-Fixing Microorganisms Detected in Oligotrophic Oceans by Amplification of Nitrogenase (nifH) Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3444-3450.
- Zhoinska, E., Lejczak, B., Kafarsi, P. (1992). Organophosphate utilization by wild-type strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2993-2999.



- Zhu, G.Y., Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. (2002). Use of green fluorescent protein to visualize rice root colonization by *Azospirillum irakense* and *A. brasilense*. *Funct. Plant Biol.* 29:1279-1285.

