

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Ciencias Naturales de 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 la codirección del Dr. Fernando Ibañez, para optar al título de Microbióloga.

Aprobado por los jurados:

Dr. Fernando Ibañez

Dra. Melina Talano

Dra. Elina Reinoso

19 de Octubre de 2012

AGRADECIMIENTOS.

- Al Dr. Fernando Ibañez, por haber confiado en mí desde un principio, por enseñarme todo lo necesario para llegar a ser una profesional, y en especial por tenerme paciencia.
- A la Dra. Adriana Fabra, por darme la posibilidad de realizar el trabajo final en el laboratorio y brindarme todos sus conocimientos.
- A todos los compañeros del laboratorio 21 por darme el lugar, por responder cada pregunta, por enseñarme, por su predisposición para conmigo. También agradezco el grupo que son, muy compañeros, y agradezco toda su buena onda.
- A mis papas Carlitos y Cristina porque sin ellos nada de esto hubiese sido posible. Eternamente agradecida a ustedes por todo, en especial por ser mis papas, los adoro con el corazón entero.
- A mi hermano Ema porque compartimos cada momento de la vida, porque a pesar de todo se que cuento con el incondicionalmente.
- A toda mi familia, por haberme acompañado en todos estos años.
- A las GORDAS, ya que de alguna forma todas estuvieron en este tiempo, algunas al principio, otras al final, pero siempre dando su apoyo, mil gracias gorditas.
- Vani, Angel, Male, Pato, Carlitos, Cele, Pablo, porque estuvieron siempre apoyándome y preocupándose por mi.
- A Cynthia, la negra, por estar en todas y por ser incondicional en mi vida, encontré una gran persona que jamás voy a olvidar; en especial este ultimo tiempo de “escribir la TESIS” pasamos días y días juntas gracias por hacer que todo sea mas fácil.
- A Agus, santita, que decir ya sabes que estoy agradecida a vos porque nos encontramos desde el comienzo de toda esta etapa, gracias por todas tus locuras y por cada palabra de aliento, encontré una gran amiga y no la voy a perder por nada del mundo, a pesar que este ultimo tiempo me abandonaste!
- A Agos, otra compañera de “los jueves”, con hermosas charlas. Gracias por estar siempre que te necesite, otra gran amiga que voy a llevar en el corazón.
- A mis compañeros: Bela, Muñi, Euge, Lula, Meli, Ema, porque son los únicos que pueden entender lo importante que es tener buenas compañías para que todo sea mas un poco mas fácil.

- A Malena, porque es la única persona que siempre me hizo reír, porque siempre me da toda su ternura todo su amor y por ser única, Te Amo mi gorda, gracias por llegar a mi vida.
- A la UNRC por brindarme lo necesario para poder realizar la tesina de grado y formarme como profesional.
- A todas y cada una de las personas que de alguna forma u otra estuvieron acompañándome en estos años!

¡MUCHAS GRACIAS!

RESUMEN

El grupo denominado “bacterias promotoras del crecimiento de las plantas” o PGPBs (del inglés *Plant Growth Promoting Bacteria*), incluye numerosos microorganismos que viven en el suelo y se asocian con distintas especies vegetales, facilitando o incrementando su crecimiento. La utilización de estos microorganismos en las prácticas agrícolas puede constituir una alternativa válida para incrementar la productividad de los cultivos en un esquema de producción sustentable y amigable con el medio ambiente, reduciendo la aplicación de agroquímicos.

En nuestro laboratorio se obtuvo una colección de aislamientos bacterianos a partir del interior de nódulos de maní, representativa del área manisera de la provincia de Córdoba. Estos aislamientos fueron caracterizados fenotípicamente y genotípicamente, revelando que dicha población es altamente heterogénea e involucra a microorganismos pertenecientes a los géneros *Bradyrhizobium* y *Rhizobium* (dentro de la Clase α -Proteobacterias), y *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Klebsiella* (ubicados en la Clase γ -Proteobacterias). Posteriormente, se determinó que los microorganismos pertenecientes a esta última Clase no eran capaces de inducir la formación de nódulos en maní, y que carecían de genes de nodulación. Por lo tanto, estos aislamientos fueron considerados como “endófitos oportunistas”, capaces de colonizar los nódulos preformados por la especie rizobiana compatible. Además, se demostró que los aislamientos pertenecientes a la colección de endófitos de nódulos son capaces de promover incrementos significativos en distintos parámetros de crecimiento y nodulación del cultivo de maní.

En este marco, el presente trabajo contribuye a la caracterización de las propiedades promotoras del crecimiento vegetal de los aislamientos endófitos de nódulos de la colección. Además, y considerando su capacidad para interactuar con diferentes especies vegetales, se evaluaron los efectos de su aplicación en dos cultivos sugeridos para ser utilizados en secuencias de rotación, el maíz y el maní. El análisis de la presencia de propiedades promotoras del crecimiento reveló que los aislamientos de la colección presentan diferentes propiedades PGPR. De manera interesante, todos los aislamientos presentaron capacidad para solubilizar fosfatos y producir AIA. Además, los aislamientos *Pseudomonas* sp. NCHA35, *Pseudomonas*

sp. NVAM24 y *Klebsiella* sp. TT001 produjeron sideróforos. Posteriormente, se analizó la capacidad de los microorganismos de la colección para colonizar y promover el crecimiento de plántulas de maíz. Los ensayos de inoculación en este cultivo revelaron que los aislamientos fueron capaces de promover su crecimiento, ya sea coinoculados en grupos conformados según su afiliación taxonómica, o inoculados individualmente. Sin embargo, en plantas coinoculadas se observó una mayor promoción del crecimiento, sugiriendo la existencia de un efecto sinérgico entre los aislamientos. Por otra parte, los aislamientos *Enterobacter* sp. NMAN11, *Enterobacter* sp. NONC13, *Pseudomonas* sp. NCHA33, *Klebsiella* sp. TT001 y/o *Klebsiella* sp. NTI31 fueron capaces de colonizar el interior de las raíces de las plántulas de maíz. Sin embargo, la capacidad endofítica de los aislamientos no parece ser relevante para el efecto promotor del crecimiento en maíz.

Las bacterias analizadas demostraron un interesante potencial para promover el crecimiento de plántulas de maní y maíz en un ensayo de rotación. Esta característica permitiría proponer la aplicación, al inicio de la rotación, de inoculantes bacterianos mixtos que promuevan el crecimiento de ambos cultivos. Sin embargo, y a pesar de ser capaces de persistir en los suelos, la reinoculación con los aislamientos luego de la cosecha de maní demostró ser una práctica más efectiva para la promoción del crecimiento del cultivo de maíz. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el conjunto de los ensayos realizados, podemos afirmar que la coinoculación de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 y *Klebsiella*, o de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 y *Pseudomonas* representan una alternativa interesante para su utilización en sistemas agrícolas que impliquen rotación de cultivos maní-maíz. Se propone comprobar la capacidad promotora del crecimiento de estos aislamientos en ensayos a campo.

INDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCION

Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)	1
Mecanismos involucrados en la promoción del crecimiento vegetal	2
Mecanismos directos	2
Producción de fitohormonas	2
Solubilización de fosfatos	3
Fijación biológica de nitrógeno	3
Mecanismos indirectos de promoción del crecimiento vegetal	4
Competencia por la utilización de fuentes de carbono (superposición de nichos)	4
Antibiosis	5
Producción de enzimas hidrolíticas	5
Inducción de la respuesta sistémica adquirida (ISR)	5
Producción de sideróforos	6
Maíz (<i>Zea mays L.</i>)	7
Maní (<i>Arachis hypogaea L.</i>)	9
Microorganismos endófitos de nódulos	12

HIPOTESIS Y OBJETIVOS 15

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas utilizadas	16
✓ Aislamientos nativos	16
Cepas de referencia	16
Medios de cultivo utilizados	17
Medio TY (Beringer, 1974)	17
Medio YEM (Vincent, 1970)	17
Medio NBRIP-BPB (Mehta y Nautiyal, 2001)	18
Medio CAS (Schwyn y Neilands, 1987)	18
Agar tripticasa soya	19
Cultivo y conservación de la colección de aislamientos	20
Análisis de propiedades promotoras del crecimiento en los aislamientos de la colección	20
Determinación de la solubilización de fosfatos	20

Determinación de la producción de sideróforos	21
✓ Determinación cualitativa de la producción de Acido Indol Acético (AIA)	21
Reactivo de Salkowski	22
Técnicas generales para los ensayos de inoculación en plantas	22
Esterilización superficial de semillas de maíz	23
Esterilización superficial de semillas de maní	24
Condiciones de cultivo de las plantas	24
Medio Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950)	25
Inoculación de las plántulas	25
Análisis de parámetros de crecimiento	26
Análisis estadístico de los datos	26
Determinación del número de microorganismos viables	26
Aislamiento de microorganismos endófitos	27
✓ ERIC-PCR	28

RESULTADOS

Determinación de las propiedades PGPR en los aislamientos de la colección	30
Determinación de la capacidad para solubilizar fosfatos	30
Determinación de la producción de sideróforos	32
Determinación de la producción de AIA	34
Inoculación de los aislamientos en plántulas de maíz	35
Coinoculación de los aislamientos en grupos conformados según su afiliación taxonómica	35
Inoculación individual de los aislamientos en plántulas de maíz	38
Aislamiento de microorganismos endofíticos	40
Análisis de la capacidad endofítica de los aislamientos en el ensayo de coinoculación	41
Análisis de la capacidad endofítica de los aislamientos en el ensayo de inoculación individual	45
Análisis de la promoción del crecimiento en un ensayo de rotación de cultivo maní- maíz	49

CONCLUSIONES 56

BIBLIOGRAFIA 57

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Colección de aislamientos nativos utilizados en el trabajo.	16
Tabla 2: Diámetro (mm) del halo de solubilización de fosfatos producido por los aislamientos a diferentes tiempos después de la siembra	31
Tabla 3: Capacidad de los aislamientos para producir sideróforos.	33
Tabla 4: Parámetros de crecimiento de las plantas de maíz inoculadas con los aislamientos.	37
Tabla 5: Parámetros de crecimiento de plántulas de maíz inoculadas	39
Tabla 6: Recuento de morfotipos bacterianos compatibles con los aislamientos inoculados.	41
Tabla 7: Recuento de morfotipos bacterianos endófitos compatibles con los aislamientos inoculados.	45
Tabla 8: Parámetros de crecimiento de las plántulas de maní inoculadas	50
Tabla 9: Recuento de microorganismos viables por gramo de suelo	51
Tabla 10: Parámetros de crecimiento vegetal de plántulas maíz.	53



Introducción

RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL (PGPR)

El suelo es una matriz viva que constituye un recurso crítico para la producción agrícola. En él coexisten diversas poblaciones bacterianas, algunas de las cuales son capaces de producir efectos benéficos sobre el crecimiento o desarrollo vegetal. El grupo denominado como “bacterias promotoras del crecimiento de las plantas” o PGPBs (del inglés *Plant Growth Promoting Bacteria*), incluye numerosas especies que viven en el suelo y se asocian con distintas especies vegetales, facilitando o incrementando su crecimiento. La rizósfera, la porción de suelo que rodea las raíces de las plantas y es influenciada física, química y biológicamente por ellas, representa un hábitat muy favorable para el desarrollo de microorganismos capaces de ejercer diferentes efectos en la planta y sobre la fertilidad del suelo (Sorensen, 1997). Aquellas bacterias capaces de promover el crecimiento vegetal que colonizan la rizósfera y la superficie de las raíces de las plantas reciben el nombre de PGPR, por *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*. La diversidad de PGPR en la rizósfera varía de acuerdo a la planta, el tipo de suelo, y la disponibilidad de nutrientes (Tilak y col., 2005). Numerosos aislamientos pertenecientes a géneros como *Aeromonas*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Arthobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Serratia* fueron identificados como PGPRs (Arnd y col., 1998; Babalola y col., 2003; Bertand y col., 2001; Bonaterra y col., 2003; Cezon y col., 2003; Dey y col., 2004; Esitken y col., 2003; Garica y col., 2003; Gupta y col., 1995; ; Hamaouri y col., 2001; Jaizme-vega y col., 2004; Joo y col., 2004; Khalid y col., 2003; Kokalis-Burelle y col., 2002; Mirza y col., 2001; Munir y col., 2003; Murphy y col., 2003; Nanda-Kumar y col., 2001; Pan y col., 1999; Preeti y col., 2002; Raj y col., 2004; Shishido y col., 1996; Tripathi y col., 2005). El incremento del crecimiento vegetal por las PGPRs puede reflejarse en un aumento de la emergencia de las plantas, en mayor vigor y biomasa vegetal y/o en la proliferación del sistema radicular y rendimiento a cosecha en varias especies (Kloepper y col., 1991; Ping y Boland, 2004; Vessey, 2003; Zahir y col., 2004).

Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal pueden ejercer su efecto de manera directa y/o indirecta. Entre los mecanismos directos podemos citar la

síntesis de fitohormonas, solubilización de fosfatos y fijación biológica de nitrógeno, entre otros (Glick y col.; 1995). Entre los efectos indirectos se encuentran la antibiosis contra microorganismos patógenos, la inducción de la resistencia sistémica adquirida (ISR) y la atenuación de efectos deletéreos de uno o varios fitopatógenos a través de la competencia por nutrientes y nicho (Bolwerk y col., 2003; Chin-A-Woeng y col., 2003; Hartmann y col., 2004; Lavicoli y col., 2003). A continuación se describen los mecanismos promotores del crecimiento más estudiados.

MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL

Mecanismos directos

Producción de fitohormonas

La estimulación del crecimiento por fitohormonas producidas por microorganismos en la zona de la raíz o dentro de la misma es uno de los mecanismos mediante los cuales las PGPR promueven el crecimiento vegetal. La auxina Ácido Indol Acético (AIA) es la fitohormona producida en mayor cantidad por las PGPRs (Vessey, 2003). El mecanismo más común para la biosíntesis de esta hormona está representado por la vía dependiente de triptófano (Patten y Glick, 1996). El AIA se encuentra involucrado en la iniciación radical, división y alargamiento celular y formación de raíces laterales (Salisbury, 1994). El desarrollo precoz de raíces representa una ventaja para las plántulas jóvenes, ya que favorece su capacidad de anclarse en el suelo y aumenta la superficie de absorción, facilitando la incorporación de agua y nutrientes.

Solubilización de fosfatos

El fósforo, después del nitrógeno, es el macronutriente más importante para el desarrollo y crecimiento de las plantas. Aún en suelos con elevado contenido de fósforo, gran parte del mismo puede encontrarse de manera insoluble en forma de fosfatos de hierro y aluminio (en suelos ácidos) o como fosfatos de calcio (en suelos alcalinos), y sólo una pequeña porción puede estar disponible para las plantas (Stevenson y Cole, 1999). Las bacterias solubilizadoras de fosfato ejercen su efecto promotor mediante el aumento de la proporción de fósforo disponible para las plantas. El principal mecanismo por el cual las bacterias solubilizan fósforo inorgánico es mediante la disminución del pH del medio a través de la liberación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, los cuales quelan los cationes unidos al fosfato, dejándolo soluble (Alexander, 1980; Goldsteind, 1995; Kim y col., 1997; Kpamblekou y Tanatanai, 1994). Se han descrito otros posibles mecanismos que incluyen la eliminación de protones y la producción de ácidos inorgánicos como el ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido carbónico (Rodríguez y Fraga, 1990). Por otra parte, la movilización de fosfato orgánico se realiza por síntesis de enzimas como las fitasas y fosfatasas ácidas y alcalinas.

Fijación biológica de nitrógeno

El nitrógeno es componente de la clorofila y es indispensable para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Este elemento constituye, junto con el agua, el principal factor limitante de la producción agrícola mundial. El continuo agotamiento de las fuentes de nitrógeno en el suelo y la necesidad de incrementar la producción de algunos cultivos ha dado lugar a un creciente interés por conservar las reservas limitadas de este elemento.

Las principales fuentes de nitrógeno en el suelo están representadas por materiales vegetales y animales, sales de amonio o nitratos arrastrados por las precipitaciones y nitrógeno obtenido mediante el proceso de fijación. Este proceso utiliza como materia prima el N₂ atmosférico y lo convierte en formas asimilables para los vegetales (Taiz y Zeiger, 1991). Esta conversión puede llevarse a cabo por

diferentes mecanismos denominados Fijación espontánea, Fijación industrial y Fijación biológica. Esta última es llevada a cabo por microorganismos procariotas y aporta más del doble del nitrógeno que los fertilizantes nitrogenados, representando un 60 % del total de nitrógeno fijado anualmente (Vinuesa, 1998; Curtis y Barnes, 1994). El grupo limitado de microorganismos procariotas capaces de fijar nitrógeno se denomina diazótrofos (diazó: nitrógeno, trofo: nutrición) e incluye bacterias heterótrofas aeróbicas, anaeróbicas estrictas o facultativas, bacterias quimioautótrofas y microorganismos fotosintéticos (cianobacterias) que convierten el nitrógeno atmosférico en nitrato, nitrito o amonio mediante la acción de la enzima nitrogenasa (Frioni, 1999; Taiz y Zeiger, 1991). Un grupo particularmente interesante de diazótrofos está conformado por los rizobios. Este grupo de bacterias del suelo posee capacidad para fijar nitrógeno luego del establecimiento de una asociación simbiótica con las raíces de las plantas leguminosas, dentro de órganos especializados denominados nódulos.

Mecanismos indirectos de promoción del crecimiento vegetal

Competencia por la utilización de fuentes de carbono (superposición de nichos)

Este mecanismo se fundamenta en la exclusión competitiva de un microorganismo patógeno cuando se enfrenta a un biocontrolador en condiciones limitantes de fuentes carbonadas. Por ello, resulta útil cuantificar el grado de solapamiento entre el biocontrolador y el patógeno en cuanto a la utilización de fuentes de carbono. Esta comparación resulta en la definición de un índice, denominado NOI (de *Niche Overlapping Index*). Cuanto más grande es el valor del índice, mayor la posibilidad de exclusión competitiva del patógeno por el biocontrolador en el sistema. La capacidad de una PGPB para competir por el nicho depende de su maquinaria enzimática para utilizar o detoxificar diferentes exudados y de su habilidad para adaptarse a condiciones ambientales cambiantes (Compant y col., 2005).

Antibiosis

El mecanismo conocido como antibiosis puede resultar de la producción de metabolitos antimicrobianos como los antibióticos, y de otros metabolitos secundarios como el ácido cianhídrico, biosurfactantes y compuestos volátiles que inhiben el desarrollo de fitopatógenos (Benitez y col., 2004; Whipps, 2001; Reyes y col., 2008). La utilidad de este mecanismo de biocontrol ha sido demostrada en diversos sistemas (Nielsen y col., 1998; Whipps, 2001).

Producción de enzimas hidrolíticas

Esta propiedad se basa en el biocontrol de patógenos mediante la producción de enzimas tales como quitinasas, glucanasas, pectinasas, lipasas, celulasas y proteasas, cuya actividad hidrolítica afecta principalmente a la pared y membrana de las células fúngicas. Por ejemplo, *Serratia marcescens* produce quitinasas extracelulares que actúan provocando la lisis del micelio de *Sclerotium rolfsii* (Rojas-Avelizapa y col., 1999). También ha sido demostrado que quitinasas y laminarinasas extracelulares sintetizadas por *Pseudomonas stutzeri* digieren y lisan el micelio de *Fusarium solani* y que la -1,3- glucanasa sintetizada por *Burkholderia cepacia* puede desarticular la pared de *Rhizoctonia solani*, *S. rolfsii* y *Pythium ultimum* (Bashan y de-Bashan, 2005).

Inducción de respuesta sistémica adquirida (ISR)

La ISR resulta de la respuesta producida por la planta a compuestos sintetizados por la PGPB (volátiles y no volátiles) e implica una cascada de reacciones de defensa que puede involucrar transducción de señales, generación de fitoalexinas, protección contra el estrés oxidativo y formación de barreras estructurales tales como el engrosamiento de la pared, deposición de calosa y acumulación de compuesto fenólicos (Reymond y Farmer, 1998). En todos estos mecanismos de defensa juegan un rol decisivo el ácido salicílico, el ácido jasmónico y el etileno. De este

modo, algunas bacterias PGPB ejercen su efecto protector contra fitopatógenos estimulando en la planta los mecanismos de defensa inducibles, por lo que se convierte en un huésped más resistente al ingreso de patógenos. Los microorganismos que promueven ISR habían sido identificados hasta hace unos años como bacterias Gram negativas, particularmente especies de los géneros *Pseudomonas* y *Serratia*. Sin embargo, ha sido demostrado que algunas cepas de *Bacillus* spp. también son capaces de estimular las respuestas de defensa de las plantas (Kloepper y col., 2004).

Producción de sideróforos

El hierro es el cuarto elemento más abundante sobre nuestro planeta, aunque su biodisponibilidad está extremadamente limitada como consecuencia de su pobre solubilidad. A pH fisiológico, el nivel de Fe^{3+} está limitado a 10^{-18} M, mientras que todos los microorganismos requieren una concentración mínima efectiva de 10^{-8} M para crecer (Braun y Hantke, 1997). Este elemento es esencial para el crecimiento de microorganismos ya que actúa como cofactor en reacciones enzimáticas de oxido-reducción.

En suelos con pH neutro o básico el hierro se encuentra en formas no solubles y, por lo tanto, no disponibles para el crecimiento de microorganismos y plantas. Algunas bacterias responden ante esta situación mediante la producción de ligandos específicos de hierro llamados sideróforos, de bajo peso molecular y alta afinidad, capaces de transportarlo al interior celular. Los sideróforos pueden actuar de forma directa sobre la promoción del crecimiento vegetal, ya que algunas plantas son capaces de unir el complejo sideróforo-hierro, transportarlo al interior y luego liberar el hierro del sideróforo para su utilización (Bar-Ness y col., 1991, 1992; Crowley y col., 1988; Wang y col., 1993).

Además, los microorganismos productores de sideróforos indirectamente protegen a las plantas de otros microorganismos fitopatógenos, debido a que compiten con ellos por el metal. Los agentes fitopatógenos también pueden producir sideróforos pero con menor capacidad para fijar el hierro, por lo que su crecimiento y desarrollo se

ven limitados. Así, la menor disponibilidad de hierro disminuye la germinación de las esporas y crecimiento hifal y puede reducir la incidencia de enfermedades ocasionadas por hongos fitopatógenos (van Rossum y col., 1994).

Las interacciones entre plantas y microorganismos que ocurren en la rizósfera son las determinantes de la sanidad vegetal y de los suelos. Además, desempeñan un rol fundamental en la transformación, movilización, y solubilización del conjunto limitado de nutrientes en el suelo y la subsecuente incorporación de los mismos para alcanzar el rendimiento óptimo de los cultivos (Jeffries y col., 2003).

La aplicación de microorganismos promotores del crecimiento vegetal puede constituir una práctica alternativa válida para incrementar la productividad de los cultivos en un esquema de producción sustentable y amigable con el medio ambiente, reduciendo la aplicación de agroquímicos. En este marco, este trabajo de Tesis contribuye a la caracterización de las propiedades promotoras del crecimiento vegetal de una colección de aislamientos bacterianos nativos de suelos agrícolas de la provincia de Córdoba. Además, se evalúan los efectos de su aplicación en dos cultivos de gran importancia regional y nacional, el maíz y el maní. Estos cultivos han sido utilizados en secuencias de rotación en suelos de nuestra región, demostrando constituir una alternativa rentable desde el punto de vista económico e interesante desde la perspectiva de una producción agrícola sustentable y del mantenimiento del recurso suelo. A continuación, se destacan algunas características relevantes de estos cultivos.

MAIZ (Zea mays L)

El maíz es una especie vegetal perteneciente a la familia de las gramíneas que no se encuentra en estado silvestre, por lo que su origen aún no ha sido elucidado por los botánicos. Los individuos de esta especie son incapaces de sobrevivir en

condiciones naturales porque no poseen mecanismos adecuados para la dispersión de sus semillas, las que al germinar producen plantas que compiten severamente entre sí, impidiendo la producción de nuevas semillas. Según lo sugerido por Galian (1988), el maíz deriva del teosinte, y fue domesticado hace 7000 a 10000 años en el sur de México (Goodman, 1988). A partir del descubrimiento de América el cultivo de maíz fue introducido en Europa, donde rápidamente se convirtió en un factor clave para la alimentación humana y animal (Watson, 1988). En la actualidad, constituye el tercer cultivo en importancia mundial después del trigo y el arroz en cuanto a volumen de producción, y representa un alimento básico en regiones de Sudamérica, América central, África, el sudeste asiático y China. Asimismo, por su gran productividad, excelente palatabilidad y alto contenido nutricional, el maíz ha reemplazado a otros cereales en la alimentación animal. Además, este cultivo tiene numerosos usos industriales como la producción de almidón, edulcorantes, alcohol, jarabes, acetona, aceites (Watson, 1988).

En cuanto a sus características botánicas, el maíz pertenece a las monocotiledóneas gramíneas. Las raíces son fasciculadas y robustas, destacándose la presencia de raíces adventicias. El tallo tiene aspecto de caña, es erecto, sin ramificaciones, y posee elevada longitud, pudiendo llegar a 4 metros de altura. Las hojas son alternas, paralelinervadas y provistas de una vaina que nace de cada nudo. El número de hojas depende de la variedad y del ciclo (Ortas, 2008).

El rendimiento del maíz está determinado principalmente por el número final de granos por unidad de superficie, el cual es función de la tasa de crecimiento del cultivo alrededor del período de floración. Por lo tanto, para alcanzar altos rendimientos, el cultivo debe lograr un óptimo estado fisiológico en floración, cobertura total del suelo y alta eficiencia de conversión de radiación interceptada en biomasa. La adecuada disponibilidad de nutrientes, especialmente a partir del momento en que estos son requeridos en mayores cantidades (estadio en el que se encuentran aproximadamente 5-6 hojas desarrolladas), asegura un buen desarrollo y crecimiento foliar y una alta eficiencia de conversión de la radiación interceptada. Los nutrientes disponibles en el suelo generalmente limitan la producción de maíz,

siendo necesario conocer los requerimientos del cultivo y la oferta del suelo para determinar las necesidades de fertilización.

El maíz es un cultivo que requiere de suelos estructurados, fértiles y profundos que permitan el desarrollo de las raíces, que eviten los encharcamientos pero que retengan agua, y que permitan un aprovechamiento óptimo de los nutrientes (Ortas, 2008). Las limitaciones en agua y/o nitrógeno suelen tener un impacto tanto en la instalación del cultivo, como en su crecimiento y desarrollo y pueden limitar la capacidad productiva potencial. El nitrógeno juega un rol crítico y es el elemento más deficitario, por lo tanto es un aspecto importante dentro de un esquema de producción de cultivos (Guevara, 2012).

El manejo adecuado del nitrógeno en el ambiente es esencial para el desarrollo de una agricultura más productiva (Newbold, 1989). En este contexto, la importancia del proceso de fijación biológica de nitrógeno es crucial, y el uso de cultivos capaces de llevar a cabo este proceso es el componente primario en una agricultura sustentable (Vance y col., 2000). Así, las leguminosas desempeñan un papel crucial en la agricultura por su capacidad de fijar nitrógeno en simbiosis, y desde hace décadas existen evidencias de su importancia en programas agrícolas de varios países (Heath y col., 1973; Summerfield y Bunting, 1980; Vincent y col., 1977). Actualmente, existen más de 30 especies leguminosas cultivadas en el mundo para alimentación humana o animal. Sin embargo, la región agroproductiva de la zona Centro-Sur de la provincia de Córdoba históricamente se caracterizó por la siembra de maní, concentrando más del 90% del total de la superficie sembrada en nuestro país.

MANÍ (*Arachis hypogaea* L.)

Taxonómicamente, el maní (*Arachis hypogaea* L.) pertenece al orden Fabales, familia Fabaceae, subfamilia Papilionoideae, género *Arachis* (Stalker, 1997). Es una

leguminosa de verano, originaria de Sudamérica (actuales territorios de Bolivia, Paraguay y Norte de Argentina). Es un cultivo capaz de adaptarse a diferentes regiones y, si las condiciones lo permiten, puede actuar como perenne y sobrevivir varios años. La planta puede alcanzar una altura de 20-60 cm, es geocárpica y su infrutescencia se desarrolla en el suelo después de la floración (Moss y Ramanatha Rao, 1995) (Figura 1).



Figura 1. Planta de maní (*Arachis hypogaea* L.).

El género *Arachis* comprende 22 especies, de las cuales 9 son noduladas y sólo una (*Arachis hypogaea* L.) es actualmente cultivada. Esta especie es la única que posee importancia económica, especialmente porque su semilla se emplea como fuente de materia prima para la industria aceitera y confitera (Cholaky y col, 1993). También es una fuente importante de proteínas ricas en arginina, posee elevados niveles de fibra soluble e insoluble, compuestos fenólicos, fitoesteroles, ácidos grasos benéficos y vitamina E, que proporcionan un amplio rango de beneficios para la salud (Kris-Etherton y col., 2008).

A nivel mundial, los principales productores del cultivo son China, India y Estados Unidos. Nuestro país también se considera un importante productor, así como el primer exportador a nivel mundial (Cámara Argentina del maní, 2012). Es interesante destacar que la región Centro-Sur de la provincia de Córdoba concentra el 96% del total de la producción, así como la totalidad del proceso de transformación. Las mayores superficies implantadas se encuentran en los departamentos Río Cuarto, Juárez Celman, Unión, General Roca, Presidente Roque Sáenz Peña, Santa María, Río Segundo, Tercero Arriba y San Martín (Figura 2).

De este modo, el cultivo de maní representa una economía regional con alto impacto económico y social, no sólo por la generación de divisas derivadas de la exportación de sus productos, sino también por la generación de trabajo a nivel predial e industrial. A ello debe agregarse su impacto en otros sectores industriales ligados tanto a la producción primaria como al procesamiento. Esta importancia socioeconómica se ha mantenido durante muchos años dentro de ciertos márgenes. Sin embargo, y con el fin de incrementar el rendimiento y la calidad del maní y sus subproductos, es necesario acrecentar el conocimiento de los actores involucrados en todas las etapas productivas (Fernandez y Giayetto, 2006).

A lo largo de los años se ha ido observando una pérdida de productividad en los suelos del área manisera de Córdoba, habiéndose determinado en ellos un bajo contenido de nitrógeno (Giayetto y col., 1998). Debido a que estos suelos con baja fertilidad no producen buenos rendimientos, y que el cultivo de maní no responde a fertilización directa, se han evaluado otras metodologías que involucran a los microorganismos como colaboradores de la fertilización (Giandana, 1997). El maní, perteneciente a la familia botánica de las leguminosas, posee la capacidad de

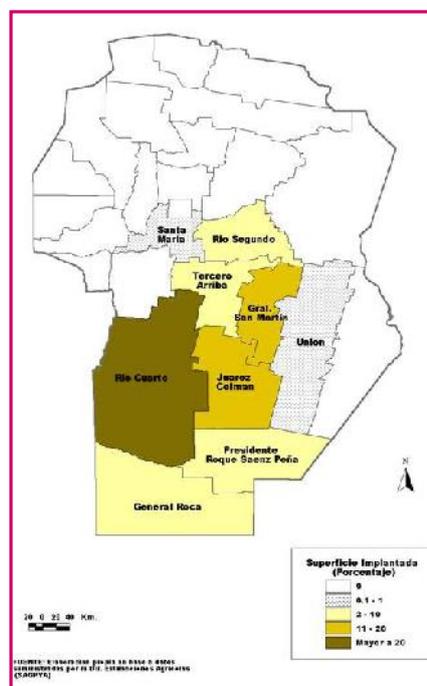


Figura 2. Principales departamentos productores de maní de la Prov. de Córdoba.

establecer una asociación simbiótica fijadora de nitrógeno con bacterias del suelo conocidas colectivamente como rizobios. El efecto morfológico asociado con esta interacción es la formación de nódulos, estructuras especializadas dentro de las cuales los rizobios se diferencian en formas pleiomórficas denominadas bacteroides y comienzan a fijar el nitrógeno atmosférico, transformándolo en compuestos asimilables por las plantas.

Hasta hace relativamente poco tiempo, se creía que los rizobios eran los ocupantes exclusivos de los nódulos. Sin embargo, diferentes trabajos comenzaron a demostrar que diversos microorganismos endofíticos también son capaces de colonizar el interior de estos órganos vegetales especializados (Fabra y col., 2010).

MICROORGANISMOS ENDÓFITOS DE NÓDULOS

El estudio de los microorganismos endofíticos es actualmente un campo en gran expansión. Las bacterias endófitas pueden ser definidas como la población procariótica que reside dentro de los organismos vivos sin ocasionar daño al hospedador (Hallmann y col., 1998). En los vegetales, el término “endófitos” ha sido comúnmente aplicado a relaciones mutualistas o comensalistas que involucran microorganismos que se encuentran en tejidos típicos, y no en órganos especializados como nódulos o tumores (Rai y col., 2007). Sin embargo, a partir del año 1999, comenzaron a incrementarse los reportes de bacterias que poseen la capacidad de localizarse en el interior de nódulos pero que son incapaces de inducir su formación (Bai y col., 2002; Benhizia y col., 2004; Cerda Castillo, 2008; de Lajudie y col., 1999; Gao y col., 2001; Kan y col., 2007; Lei y col., 2008; Li y col., 2008; Liu y col., 2005; Mhamdi y col., 2002; ; Palaniappan y col., 2010; Rajendran y col., 2008; Stajkovic y col., 2009; Tokala y col., 2002; Trujillo y col., 2010; Wang y col., 2006; Zakhia y col., 2006).

En nuestro laboratorio se obtuvo una colección de aislamientos bacterianos a partir de nódulos de maní, representativa del área manisera de la provincia de Córdoba. Estos aislamientos fueron caracterizados fenotípicamente y genotípicamente. Los resultados revelaron que dicha población es altamente heterogénea e involucra a microorganismos de crecimiento lento y rápido (Ibañez y col., 2008; Taurian y col., 2002). El análisis de la secuencia del gen ARNr 16S de los aislamientos obtenidos reveló que pertenecen a los Géneros *Bradyrhizobium* y *Rhizobium* (dentro de la Clase α -Proteobacterias), y *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Klebsiella* (ubicados en la Clase γ -Proteobacterias). Posteriormente, se determinó que los microorganismos pertenecientes a esta última Clase no eran capaces de inducir la formación de nódulos en maní, y que carecían de genes de nodulación (Ibañez y col., 2009). Por lo tanto, estos aislamientos fueron considerados como “endófitos oportunistas”, ya que poseen la capacidad de localizarse en nódulos formados por la especie rizobiana compatible.

Las bacterias endófitas de nódulos constituyen una población de microorganismos que interactúa directa o indirectamente con los rizobios simbiotes. De esta manera, su presencia en los nódulos podría afectar el desarrollo de una simbiosis fijadora de nitrógeno efectiva. Del mismo modo, su capacidad de actuar como promotores del crecimiento vegetal podría afectar positivamente el desarrollo de la planta. En este sentido, se demostró que los aislamientos pertenecientes a la colección de endófitos de nódulos son capaces de promover incrementos significativos en distintos parámetros de crecimiento y nodulación del cultivo de maní (Ibañez y col., 2009).

Los nódulos constituyen un ambiente controlado en el que las bacterias ocupantes pueden multiplicarse desde unas pocas células hasta alcanzar valores de $4 \cdot 10^9$ UFC/g (Sturz y col., 1997). Teniendo en cuenta que estos microorganismos pueden ser liberados al suelo a partir de nódulos senescentes, estos órganos vegetales especializados podrían ser considerados como lugares de supervivencia y multiplicación de ciertos organismos del suelo, que contribuyen a la persistencia de estos genotipos microbianos en el ecosistema. Considerando la secuencia de rotación de cultivos sugerida para maní, resulta de interés analizar si la colección de

microorganismos obtenida a partir del interior de los nódulos de esta leguminosa posee también capacidad para colonizar y promover el crecimiento de plántulas de maíz. Esta característica permitiría proponer la aplicación, al inicio de la rotación, de inoculantes bacterianos mixtos que promuevan el crecimiento de ambos cultivos.



Hipótesis y objetivos

HIPÓTESIS

Las bacterias endófitas de nódulos de maní constituyen una población que presenta interesantes propiedades promotoras del crecimiento vegetal que pueden favorecer el desarrollo de diferentes genotipos vegetales. Esta característica, en conjunto con su capacidad de localizarse como endófitos (lo que les permite sobrevivir y persistir en el agroecosistema), las hace particularmente útiles para su utilización en sistemas agrícolas que impliquen rotación de cultivos.

OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento de la promoción del crecimiento vegetal mediada por PGPRs, en relación con su capacidad para localizarse como endófitos y para interactuar con diferentes especies de plantas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la presencia de actividades promotoras del crecimiento vegetal en una colección de bacterias endófitas de nódulos de maní.
- Evaluar los efectos de su inoculación sobre el crecimiento de plántulas de maíz.
- Identificar aislamientos de la colección que promuevan el crecimiento en las dos especies vegetales analizadas para realizar ensayos de inoculación en condiciones controladas que simulen rotaciones maní-maíz.
- Generar conocimientos aplicables al desarrollo de formulaciones de inoculantes mixtos (*Bradyrhizobium*-endófitos promotores del crecimiento vegetal) para sistemas agronómicos que impliquen rotaciones maíz-maní.



Materiales y métodos

CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS

AISLAMIENTOS NATIVOS

Se utilizó una colección conformada por 7 aislamientos nativos previamente obtenidos a partir del interior de nódulos de maní esterilizados superficialmente (Ibañez y col., 2009). Las características más relevantes de los aislamientos se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Colección de aislamientos nativos utilizada en el trabajo.

<i>Aislamiento</i>	<i>Número de acceso ADNr 16S (GenBank)</i>	<i>Clasificación taxonómica</i>	<i>Grupo Bacteriano</i>
NTI31	EF442063	<i>Klebsiella sp.</i>	γ -Proteobacteria
TT001	EF442065	<i>Klebsiella sp.</i>	γ -Proteobacteria
NONC13	EF442069	<i>Enterobacter sp.</i>	γ -Proteobacteria
NMAN11	EF442066	<i>Enterobacter sp.</i>	γ -Proteobacteria
NCHA35	EF442064	<i>Pseudomonas sp.</i>	γ -Proteobacteria
NVAM 24	EF442067	<i>Pseudomonas sp.</i>	γ -Proteobacteria
NCHA33	EF442068	<i>Pseudomonas sp.</i>	γ -Proteobacteria

CEPAS DE REFERENCIA

Se utilizaron las siguientes cepas de referencia

- *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144 (MIRCEN, Brasil).
- *Serratia sp.* S119 (Taurian y col., 2010)
- *Azospirillum brasilense* Cd.

MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

MEDIO TY (Beringer, 1974)

Triptona	5 g/l
Extracto de levadura	3 g/l
Cl ₂ Ca.2H ₂ O	0,5 g/l

Para la obtención del medio de cultivo sólido, se agregó Agar en una concentración de 15 g/l.

MEDIO YEM (Vincent, 1970)

K ₂ PO ₄ H	0,5 g/l
MgSO ₄	0,2 g/l
NaCl	0,1 g/l
Extracto de levadura	1 g/l
Manitol	10 g/l
Agar	15 g/l
pH	6,8 – 7

Para obtener el medio sólido (YEMA) se agregó Agar en una concentración de 15 g/l y 10 ml/l de una solución al 0,25% del colorante Rojo Congo.

MEDIO NBRIP-BPB (Mehta y Nautiyal, 2001)

Glucosa	10 g/l
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5 g/l
MgCl ₂ .6H ₂ O	5 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 g/l
KCl	0,2 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 g/l
BPB	0,025 g/l
Agar	15 g/l
pH	7

MEDIO CAS (Schwyn y Neilands, 1987)

Para preparar 200 ml de agar CAS, se agregó:

Pipes (buffer free acid pH 6,8)	6,1 g
Triptona	0,032 g
Triptófano 1% solución stock	0,6 ml
Bactoagar	3 g
MM9 10X solución stock*	20 ml
CAS 10X solución stock*	20 ml
Manitol 1M*	2 ml
MgSO ₄ *	0,1 ml
CaCl ₂ *	0,2 ml
Vitaminas solución stock*	0,1 ml

* Se agregó luego de autoclavar el medio.

MM9 10X solución stock.

KH ₂ PO ₄	0,2 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1 g
Agua destilada	100 ml

CAS 10X solución stock.

- Solución 1
 - o 60,5 mg de CAS en 50 ml de H₂O deionizada.
 - o 10 ml de Fe₂Cl₃.6H₂O (1mM) disueltos en ClH 10 mM.
- Solución 2
 - o 72,9 mg de hexadecyltrimethylamoniumbromide (HDTMA) en 40 ml de H₂O deionizada.

Se mezclaron las dos soluciones dando un color azul intenso, se autoclavó y se conservó a 4°C.

Solución stock de vitaminas.

- 20 mg/100 ml de riovflavina; ácido p-aminobenzoico; ácido nicotínico; D-biotina; D- pantotenato de calcio; piridoxal-ClH.
- 200 mg/100 ml de tiamina-ClH.

AGAR TRIPTICASA SOYA

Se pesaron 40 g del medio deshidratado (Britania) y se agregaron 1000 ml de agua destilada. Para la obtención del medio al 10% se pesaron 4 g y se colocaron en 1000 ml de agua destilada.

Para la preparación del medio con triptófano (concentración final 5 mM), se agregó al medio de cultivo estéril y fundido el volumen correspondiente de una solución stock de triptófano 0,5 M previamente esterilizada por filtración, se homogeneizó, y se ajustó el pH a 6 mediante el agregado de NaOH 5 N.

CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE LA COLECCIÓN DE AISLAMIENTOS

Los aislamientos NVAM24, NCHA33, NCHA35, TT001, NTI31, NMAN11, NONC13 y S119 y la cepa *Azospirillum brasilense* Cd fueron cultivados en medio TY (Beringer, 1974). Cuando fue necesario, se adicionó al medio el antibiótico cloranfenicol (40 µg/ml). *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 fue cultivado en medio YEM (Vincent 1970).

Para la conservación de las cepas a largo plazo, se tomaron alícuotas de cultivos en fase logarítmica tardía que fueron suplementados con glicerol estéril hasta alcanzar una concentración final de 40%.

ANÁLISIS DE PROPIEDAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO EN LOS AISLAMIENTOS DE LA COLECCIÓN

I- DETERMINACIÓN DE SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS

Con el propósito de evaluar la capacidad de los aislamientos para solubilizar fosfatos, se realizaron inoculaciones en medio NBRIP-BPB (Mehta y Nautiyal, 2001). Este medio posee fosfato tricálcico (insoluble), por lo que la presencia de un halo transparente alrededor de la colonia indica la solubilización de fosfatos. Además, este medio contiene el indicador azul de bromofenol (BPB), el cual vira a amarillo cuando el medio es acidificado por la liberación de ácidos por parte de los aislamientos.

Se realizaron inoculaciones de 10 µl de cultivos de los aislamientos por triplicado en el medio y se incubaron por 7 días. Luego, se midieron los halos de solubilización alrededor de cada colonia. Como control positivo, se utilizó el aislamiento solubilizador de fosfatos *Serratia sp.* S119.

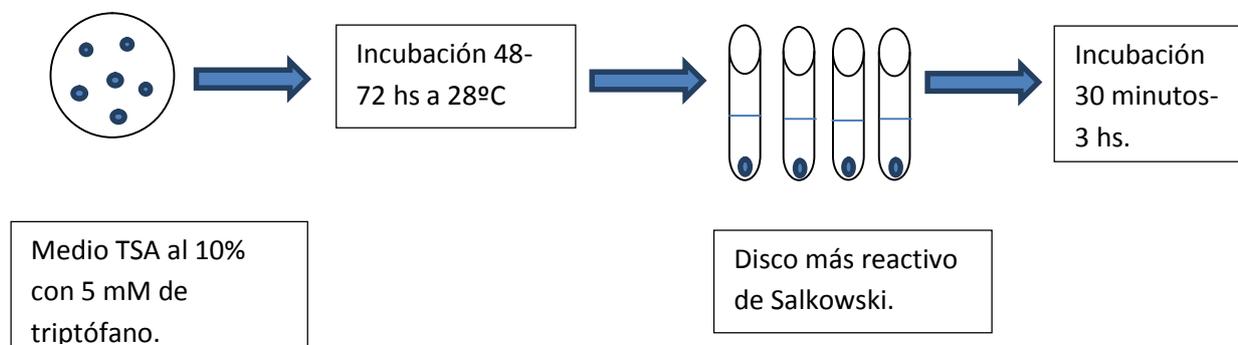
II- DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS

La capacidad de producir sideróforos por parte de los aislamientos fue evaluada en el medio de cultivo CAS (Cromo – Azurol S) (Schwyn y Neilands, 1987). En este medio, el complejo ternario azurol S/hierro III/bromuro de hexadecil trimetil amonio (HTDMA) es utilizado como indicador. Cuando un agente quelante remueve hierro del medio, el indicador vira del color azul al anaranjado. Las placas de Petri conteniendo medio CAS fueron inoculadas con los aislamientos a analizar e incubadas a 28°C durante 3 a 7 días. La aparición de halos de color anaranjado alrededor de las colonias indicó producción de sideróforos.

III- DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA)

Para la determinación de esta actividad se siguió el método descrito por Bric y col. (1991). Para ello, se emplearon placas de Petri conteniendo medio Trypticase Soya Agar (TSA) (Britania) diluído al 10% y suplementado con 5 mM de L- triptófano. Se colocaron sobre el medio pequeños discos de nitrocelulosa, que fueron inoculados con los aislamientos a ensayar. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 48 a 72 horas. Luego, los discos de nitrocelulosa con el crecimiento bacteriano fueron colocados en tubos de ensayo que contenían el reactivo de Salkowski (Gordon y Weaver, 1951). Se observó el desarrollo de la reacción entre 30 minutos y 3 horas, consignando como positivos aquellos tubos que demostraran la presencia de un

color rosado. Este color se obtiene por la reacción del AIA con los iones férricos en medio perclórico.



REACTIVO DE SALKOWSKI

H ₂ SO ₄	300 ml
FeCl ₃ 0,5 M	15 ml
H ₂ O	500 ml

TÉCNICAS GENERALES PARA LOS ENSAYOS DE INOCULACIÓN EN PLANTAS

El análisis de las propiedades promotoras del cultivo de los aislamientos de la colección se realizó en diferentes ensayos, a saber:

- I- *Análisis de la promoción del crecimiento sobre plantas de maíz.* En este ensayo, los aislamientos fueron inoculados individualmente o coinoculados (en tratamientos conformados según su afiliación taxonómica) sobre plantas de maíz. A los 30 días PI (post inoculación), se cosecharon las plantas y se evaluaron parámetros de crecimiento vegetal.
- II- *Análisis de la promoción del crecimiento en un ensayo de rotación de cultivos maní-maíz.* En este ensayo, se cultivaron en macetas plantas de maní coinoculadas con el simbionte *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144 y los

aislamientos endofíticos por el término de 80 días, momento en el que ocurre la senescencia nodular. El objetivo es permitir que los nódulos senescentes liberen al suelo los microorganismos que se albergan en su interior. Las plantas de maní fueron cosechadas y se evaluaron diferentes parámetros simbióticos y agronómicos. Luego, se determinó el número de microorganismos inoculados originalmente que permanecían viables en el suelo luego de la cosecha de las plantas de maní. Posteriormente, semillas de maíz fueron sembradas en las mismas macetas. Tres macetas por tratamiento fueron reinoculadas con los aislamientos de la colección, para incrementar su número en el sustrato. Las plantas de maíz se mantuvieron por un lapso de 30 días. Finalmente, se cosecharon y se evaluaron diferentes parámetros de crecimiento vegetal.

A continuación se detallan los procedimientos experimentales generales para los ensayos de inoculación en plantas.

Esterilización superficial de semillas de maíz

Semillas de maíz híbrido NK900 TD MAX fueron seleccionadas por su tamaño uniforme. Para su esterilización superficial, las semillas fueron sumergidas en etanol al 96% durante 30 segundos. Luego se descartó el alcohol y se realizó un lavado con agua estéril. Se agregó hipoclorito de sodio al 6 % durante 10 minutos. Finalmente, se descartó la solución de hipoclorito y se realizaron de 5 a 6 lavados con agua estéril (Pereira y col., 2011). Las semillas esterilizadas superficialmente se depositaron en placas de Petri previamente esterilizadas conteniendo algodón y papel de filtro y se incubaron en estufa a 28°C en oscuridad, hasta que la radícula alcanzó una longitud aproximada de 2-3 cm.

Esterilización superficial de semillas de maní

Semillas de maní variedad Runner cultivar Tegua fueron seleccionadas por su tamaño y color uniforme y luego fueron esterilizadas superficialmente siguiendo la metodología descrita por Vincent (1970). Brevemente, las semillas fueron sumergidas en etanol al 96% por 30 segundos, luego se descartó el alcohol y se realizó un lavado con agua estéril. Posteriormente, se agregó peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 20% durante 15 minutos y finalmente se realizaron de 5 a 6 lavados con agua estéril. Las semillas esterilizadas superficialmente se depositaron en placas de Petri previamente esterilizadas conteniendo algodón y papel de filtro y se incubaron en estufa a 28°C en oscuridad, hasta que la radícula alcanzó una longitud aproximada de 2-3 cm.

Condiciones de cultivo de las plantas

Las semillas pre-germinadas fueron transferidas a macetas estériles que contenían una cantidad adecuada de arena volcánica previamente esterilizada en estufa o autoclave. Las plantas fueron incubadas en una cámara de cultivo con un fotoperíodo de 18/6 hs (luz/oscuridad). Aquellos tratamientos que implican inoculación o coinoculación con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 fueron regados con soluciones nutritivas con nitrógeno, ya que la presencia de este nutriente inhibe la nodulación.

Por ello, el riego de las plantas se realizó con agua de red estéril, medio Hoagland libre de nitrógeno (Hoagland, 1950). Para analizar el efecto de la solubilización de fosfatos por parte de los aislamientos en el crecimiento de las plantas, algunos tratamientos fueron regados con solución de Hoagland sin nitrógeno y sin fuente de fosfato y otros con solución de Hoagland sin nitrógeno y con una fuente insoluble de fosfato (fosfato tricálcico en una concentración de 2 g/l).

Para los ensayos de rotación de cultivos se utilizó como sustrato de crecimiento para las plantas suelo proveniente de un campo de la zona de Río Quinto. Para este suelo se determinó un bajo contenido de fósforo (7 ppm). Para la realización del ensayo, el suelo fue esterilizado en estufa.

MEDIO HOAGLAND (Hoagland y Arnon, 1950)

CaCl ₂	1M	10 ml/l
ClK	1M	10 ml/l
PO ₄ H ₂ K	1M	2ml/l
SO ₄ Mg	1M	4 ml/l
FeCl ₃	5 mg/ml	2ml/l
ZnSO ₄ 7H ₂ O	1mM	4 ml/l
Solución micronutrientes		2ml/l

Solución de micronutrientes

H ₃ BO ₃	2,83 g/l
MnCl ₂	1,81 g/l
ZnCl ₂	0,11 g/l
CuSO ₄	0,05 g/l
NaMoO ₄	0,025 g/l

Inoculación de las plántulas

Las plántulas de maní o maíz fueron inoculadas a los 4 días post-emergencia con una suspensión bacteriana preparada a partir de una colonia aislada que fue transferida a medio de cultivo TY o, alternativamente, YEM. Los cultivos fueron incubados a 28°C hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento (~1.10⁹ UFC/ml). Posteriormente se tomaron 4-5 ml de estos cultivos que fueron depositados sobre la raíz de las plántulas. Para las coinoculaciones, los aislamientos fueron cultivados por separado en sus medios de crecimiento correspondientes, y luego se agregó 5 ml de cada uno de ellos a las macetas. Las plantas fueron cosechadas a los 30 u 80 días post inoculación de acuerdo al ensayo.

Análisis de parámetros de crecimiento

Para evaluar el crecimiento de las plantas, se registraron los siguientes parámetros luego de la cosecha:

- Peso fresco aéreo.
- Peso seco aéreo.
- Peso fresco radical.
- Peso seco radical.
- Longitud aérea.
- Longitud radical.
- Número de nódulos (para el caso de las plantas de maní).

Análisis estadístico de los datos

Las pruebas estadísticas ANOVA y Dunnet se realizaron utilizando el programa SigmaStat 3.5.

Determinación del número de microorganismos viables en el suelo

En los ensayos de rotación maní-maíz, y con el fin de conocer el número de microorganismos inoculados que permanecían viables luego de la cosecha del primer cultivo, se determinó el número de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo. Para ello, se tomaron muestras de 1 g de suelo de 3 macetas por cada tratamiento. Luego, se realizaron diluciones seriadas (hasta 10^{-4}), y se realizó el recuento de células viables mediante la técnica de microgota en medio TY adicionado con el antibiótico cloranfenicol.

Aislamiento de microorganismos endófitos

Para el aislamiento de microorganismos endofíticos, se realizó la esterilización superficial de la raíz. Para ello, en una primera etapa se realizaron lavados de las raíces con agua corriente para eliminar las partículas de suelo adheridas. Luego, se tomó una porción de raíz (aproximadamente 1 g) que fue sumergida en etanol 70% por dos minutos y posteriormente lavada con agua. Finalmente, se colocó la raíz en hipoclorito de sodio al 3% por 4 minutos y se realizaron lavados con agua estéril para eliminar los restos de cloro.

Posteriormente, la raíz fue macerada en un mortero estéril con solución fisiológica y se realizaron diluciones seriadas (hasta 10^{-3}) que fueron sembradas por triplicado en medio TY suplementado con cloranfenicol. Las placas se incubaron en estufa por 24-48 horas y luego se realizó el recuento de bacterias endófitas.

Para confirmar la esterilización superficial de las raíces, el agua obtenida del último lavado de las mismas fue sembrada en el mismo medio. Las placas se incubaron en estufa por 24-48 horas y luego se comprobó la ausencia de crecimiento bacteriano.

Para la identificación de los microorganismos endofíticos, se los caracterizó genotípicamente mediante la técnica de ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) -PCR. Para ello, en una primera etapa se realizó la extracción del ADN genómico de los aislamientos con resinas (Walsh y col., 1991). Brevemente, se tomaron dos colonias de los microorganismos, se resuspendieron en 300 μ l de CINA 1M y la mezcla se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos. Luego se descartó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 300 μ l de agua bidestilada estéril, y la suspensión se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Por último, se agregó 300 μ l de resina al pellet celular, se homogeneizó y llevó al termociclador por 20 minutos a 55° C y luego 8 minutos a 99° C. Los moldes así obtenidos fueron utilizados en una reacción de ERIC-PCR.

ERIC-PCR

Con el fin de confirmar la identidad de los aislamientos inoculados y de los aislamientos endofíticos obtenidos, se realizó una técnica de caracterización genotípica basada en la PCR denominada ERIC-PCR.

El volumen final de la reacción fue de 12 μ l, y contenía:

- Buffer 2,4 μ l.
- Cl_2Mg 2,88 μ l.
- dNTP 2,4 μ l.
- P1 (primer) 1,5 μ l.
- P2 (primer) 1,5 μ l.
- Taq polimerasa 0,15 μ l.
- H_2O 9,67 μ l.
- DNA 3,5 μ l.

Para la amplificación se utilizaron los primers E1 y E2 (de Bruijn, 1992):

- E1: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'

- E2: 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'

Las amplificaciones se realizaron con el siguiente ciclo de temperaturas:

- 95°C 1 minuto.

- 94°C 1 minuto.

- 52°C 1 minuto.

- 65°C 8 minutos.

- 68°C 16 minutos.



X 35

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis horizontal en geles de agarosa 2%. La corrida electroforética se realizó a 75 V utilizando buffer

TBE 0,5X. Los geles fueron teñidos con Bromuro de Etidio y visualizados en el transiluminador de luz UV.



Resultados y discusión

DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES PGPR EN LOS AISLAMIENTOS DE LA COLECCIÓN

Con el objetivo de evaluar la presencia de actividades promotoras del crecimiento en los aislamientos endofíticos de nódulos de la colección, se determinó su capacidad para solubilizar fosfatos y producir sideróforos y Ácido Indol Acético (AIA).

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD PARA SOLUBILIZAR FOSFATOS

Para la determinación de la capacidad solubilizadora de fosfatos, se midió el diámetro del halo transparente de solubilización producido por los aislamientos crecidos en el medio NBRIP-BPB (Mehta y Nautiyal, 2001) (Figura 3). Los datos fueron registrados 1, 4 y 7 días después de la siembra de los aislamientos (Tabla 2).

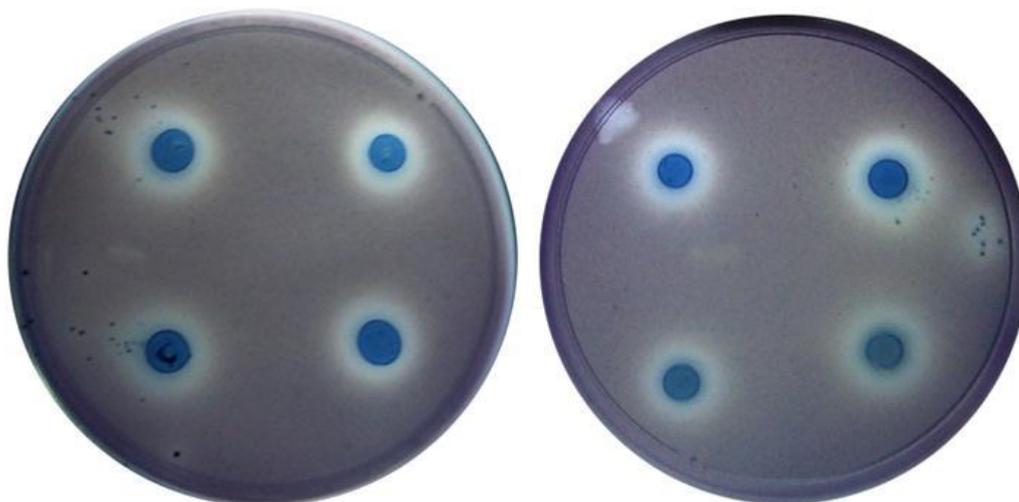


Fig. 3. Imagen representativa que muestra la formación de un halo transparente de solubilización de fosfato alrededor de las colonias bacterianas.

Tabla 2. Diámetro (en mm) del halo de solubilización de fosfatos producido por los aislamientos a diferentes tiempos después de la siembra.

AISLAMIENTO	DÍA 1	DÍA 4	DÍA 7
<i>Pseudomonas</i> sp. NCHA 35	2,33 ± 0,33	5,33 ± 0,24	5,33 ± 0,24
<i>Pseudomonas</i> sp. NCHA 33	1,50 ± 0,50	3,67 ± 0,24	4,00 ± 0,41
<i>Pseudomonas</i> sp. NVAM 24	3,33 ± 0,33	4,33 ± 0,47	5,00 ± 0,41
<i>Klebsiella</i> sp. NTI31	2,33 ± 0,33	4,00 ± 0,41	4,00 ± 0,41
<i>Klebsiella</i> sp. TT001	2,33 ± 0,33	3,00 ± 0,45	3,00 ± 0,45
<i>Enterobacter</i> sp. NMAN11	2,00 ± 0,58	3,00 ± 0	3,00 ± 0
<i>Enterobacter</i> sp. NONC13	2,33 ± 0,33	3,00 ± 0,41	3,33 ± 0,24
<i>Serratia</i> sp. S119 (Control positivo)	3,00 ± 0,58	8,33 ± 0,24	9,00 ± 0,41

Los datos representan la media ± error estándar de 3 repeticiones.

Los resultados indican que todos los aislamientos de la colección fueron capaces de solubilizar fosfatos. Los niveles de solubilización son variables, destacándose los aislamientos *Pseudomonas* sp. NCHA35 y NVAM24 como los que evidenciaron mayor actividad. Estos valores son similares a los informados por Taurian y col. (2010) para algunos aislamientos obtenidos de filósfera, rizósfera y tejidos vegetales de plantas de maní cultivadas en la provincia de Córdoba.

La solubilización del fósforo mediada por bacterias del suelo es uno de los mecanismos más importantes de promoción del crecimiento vegetal. La mayoría de los suelos contienen grandes reservas de fósforo que, en gran parte, son el resultado de la aplicación de fertilizantes (Richardson, 1994). Sin embargo, menos del 5% del fósforo contenido en el suelo es asimilable por las plantas, las cuales sólo pueden utilizar fósforo inorgánico (Rending y Taylor, 1989). Se calcula que el 40% de los suelos agrícolas del planeta son deficientes en fósforo asimilable, incluso aquellos fértiles (Batjes, 1997). Las bacterias solubilizadoras de fosfatos constituyen entre el 1% y el 50% de la población total de microorganismos del suelo (Chabot y col., 1996).

Thien y Myers (1992) indicaron que, por efecto de la actividad microbiana, la disponibilidad del fósforo en un suelo bioactivo puede aumentarse marcadamente. El uso de aislamientos solubilizadores de fosfatos en forma de bioinoculantes permite una mayor eficiencia de absorción de los fertilizantes en los suelos, disminuyendo la necesidad de aplicación de fertilizantes fosfatados. Esto resulta en un beneficio agronómico, ya que la producción y aplicación de fertilizantes implica un alto costo que repercute negativamente en el manejo de los cultivos (Raghothama y Karthikeyan, 2005). Además, el aumento en la demanda de fertilizantes fosfatados puede resultar en un agotamiento de las fuentes actuales de este nutriente (Runge-Metsger, 1995).

DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS

Los sideróforos son agentes quelantes de hierro, el cuarto metal más abundante en los suelos (Crichton y Charlotheaux-Wauters, 1987) y uno de los micronutrientes esenciales para prácticamente todos los seres vivos. En condiciones fisiológicas, el hierro puede existir en forma ferrosa (Fe^{2+}) o férrica (Fe^{3+}). A pesar de su abundancia en la naturaleza, en condiciones fisiológicas (presencia de oxígeno y pH neutro) este elemento está escasamente disponible debido a la rápida oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} y la subsecuente formación de hidróxidos insolubles (Harrington y Crumbliss, 2009).

Para la determinación cualitativa de la capacidad de producir sideróforos por parte de los aislamientos, se registró la aparición de un halo anaranjado alrededor de las colonias cuando fueron crecidos en medio CAS (Schwyn y Neilands, 1987). Los datos se registraron 1, 4 y 7 días después de la siembra de los aislamientos (Tabla 3).

Tabla 3. Capacidad de los aislamientos para producir sideróforos.

AISLAMIENTO	DIA 1	DIA 4	DIA 7
<i>Pseudomonas</i> sp. NCHA 35	+	+	+
<i>Pseudomonas</i> sp. NCHA 33	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. NVAM 24	+	+	+
<i>Klebsiella</i> sp. NTI 31	-	-	-
<i>Klebsiella</i> sp. TT 001	-	+	+
<i>Enterobacter</i> sp. NMAN 11	-	-	-
<i>Enterobacter</i> sp. NONC 13	-	-	-

Referencias: +, producción; -, ausencia de producción.

Los resultados indicaron que tres aislamientos (*Pseudomonas* sp. NCHA35, *Pseudomonas* sp. NVAM24 y *Klebsiella* sp. TT001) fueron capaces de producir sideróforos.

La capacidad para producir sideróforos es una característica altamente deseable en un aislamiento PGPR ya que estos compuestos, en conjunto con otros metabolitos como antibióticos y bacteriocinas, participan en el biocontrol de microorganismos patógenos. Se ha propuesto que los sideróforos pueden secuestrar el hierro del ambiente rizosférico, impidiendo que esté disponible para el crecimiento de los patógenos. Además, estos compuestos juegan un rol importante en la absorción de hierro por parte de la planta (Loper y Buyer, 1991), quelando el metal y cediéndolo al vegetal. El hierro es esencial para el metabolismo celular como cofactor de numerosas enzimas (Wandersman y Delepelaire, 2004), además de cumplir diversas funciones en procesos biológicos relevantes como transporte de oxígeno, síntesis de ADN, fijación de nitrógeno, respiración celular y fotosíntesis (Greenshields y col., 2007). Además, la capacidad de producir sideróforos representa una ventaja ecológica, ya que los microorganismos productores pueden ocupar nuevos nichos en la rizósfera, desplazando la demás microbiota del suelo (Kloepper y col., 1980).

DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE AIA

Otra propiedad PGPR interesante constituye la capacidad de los microorganismos para producir fitohormonas. Entre ellas, el Ácido Indol Acético ha recibido particular atención. Esta fitohormona promueve la longitud radical y la formación de raíces laterales, dando como resultado un aumento de la superficie radicular y permitiendo una mejor absorción de nutrientes por parte de la planta.

La determinación cualitativa de la producción de AIA se evidenció a través de la reacción entre discos con crecimiento bacteriano y el reactivo de Salkowski. Aquellos microorganismos que fueron capaces de sintetizar AIA o análogos produjeron un color rosado luego de la adición del reactivo de Salkowski (Figura 4).

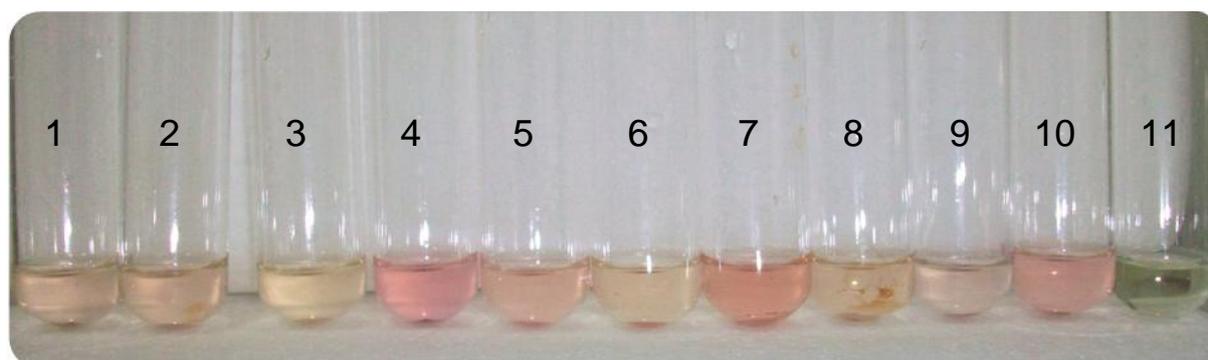


Fig. 4: Producción de AIA por parte de los aislamientos de la colección. 1, *Pseudomonas* sp. NVAM24; 2, *Pseudomonas* sp. NCHA33; 3, *Pseudomonas* sp. NCHA35; 5, *Klebsiella* sp. TT001; 6, *Klebsiella* sp. NTI31; 8, *Enterobacter* sp. NONC13; 9, *Enterobacter* sp. NMAN11; 11, Control negativo. Los tubos 4, 7 y 10 corresponden a la mezcla de los aislamientos de cada género bacteriano (*Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, respectivamente).

Los resultados demostraron que todos los aislamientos ensayados fueron capaces de producir AIA. Es interesante destacar que la técnica utilizada solamente permite la detección cualitativa de la fitohormona. No obstante, pueden observarse diferentes tonalidades de color que sugieren mayor o menor producción de la misma.

Una característica deseable de las PGPRs productoras de AIA es que produzcan un nivel adecuado de la fitohormona. La formación de raíces laterales y adventicias es estimulada por concentraciones elevadas de AIA, mientras que la longitud de las raíces primarias es estimulada por bajos niveles del mismo (Alvarez y col., 1989; Meuwley y Pilet, 1991; Peck y Kinde, 1995; Pilet y Saugy, 1987). Por otro lado, concentraciones demasiado elevadas producen un efecto deletéreo en las plantas, ya que inducen la biosíntesis del etileno.

En esta sección se presentaron los resultados correspondientes al análisis de tres propiedades promotoras del crecimiento vegetal significativas: solubilización de fosfatos y producción de sideróforos y AIA. Sin embargo, resultan de interés los aislamientos *Pseudomonas* sp. NCHA35, *Pseudomonas* sp. NVAM24 y *Klebsiella* sp. TT001 por presentar las tres propiedades analizadas. Tomados en conjunto, los datos demostraron que todos los aislamientos de la colección presentan, al menos, una de las características. Por ello, teniendo en cuenta estos resultados, y la capacidad de los aislamientos para incrementar el crecimiento de plántulas de maní (Ibañez y col., 2009), se decidió analizar los efectos de la inoculación de todos los aislamientos de la colección sobre plántulas de maíz.

INOCULACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS EN PLÁNTULAS DE MAÍZ

Coinoculación de los aislamientos en grupos conformados según su afiliación taxonómica.

Se determinaron los efectos de la coinoculación de los aislamientos en plántulas de maíz. Para ello, los aislamientos fueron coinoculados en tres tratamientos conformados según su afiliación taxonómica, a saber:

***Enterobacter* sp.:** Coinoculación de los aislamientos *Enterobacter* sp. NONC13 y *Enterobacter* sp. NMAN11.

***Pseudomonas* sp.:** Coinoculación de los aislamientos *Pseudomonas* sp. NCHA33, *Pseudomonas* sp. NCHA35 y *Pseudomonas* sp. NVAM24.

***Klebsiella* sp.:** Coinoculación de los aislamientos *Klebsiella* sp. NTI31 y *Klebsiella* sp. TT001.

Las plantas de maíz se mantuvieron hasta los 30 días PI. Luego, fueron cosechadas y se registraron los siguientes parámetros indicadores de crecimiento vegetal: peso fresco aéreo y radical; peso seco aéreo y radical y longitud aérea (Tabla 4). El efecto producido por la inoculación de los aislamientos pudo ser observado a simple vista, diferenciándose notablemente el mayor tamaño y el color verde intenso de las plantas inoculadas con respecto a las plantas sin inocular (Figura 5).

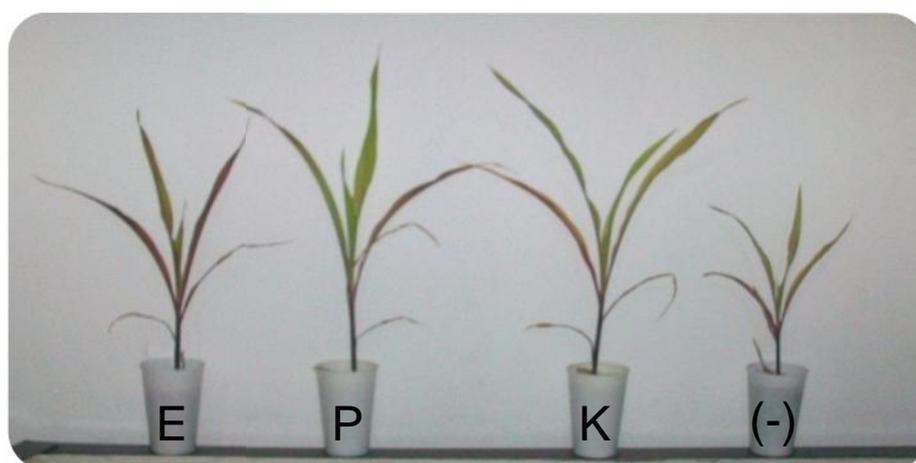


Figura 5. Aspecto de las plantas de maíz. Referencias: E, *Enterobacter*; P, *Pseudomonas*; K, *Klebsiella*, (-) control sin inocular.

Tabla 4. Parámetros de crecimiento de plantas de maíz inoculadas con los aislamientos.

Tratamiento	PF PA (g)	PF Radical (g)	Long Aérea (cm)	PS PA (g)	PS Radical (g)
<i>Enterobacter</i>	3,86 ± 0,35*	6,30 ± 0,60*	34,64 ± 1,12*	0,76 ± 0,01*	0,95 ± 0,14
<i>Klebsiella</i>	4,18 ± 0,30*	6,44 ± 0,50*	38,00 ± 1,78*	0,85 ± 0,01*	0,81 ± 0,01
<i>Pseudomonas</i>	4,2 ± 0,46*	6,08 ± 0,44*	42,5 ± 1,69*	0,73 ± 0,06*	1,43 ± 0,28*
Control sin inocular	1,77 ± 0,12	3,05 ± 0,22	26,20 ± 0,86	0,31 ± 0,01	0,55 ± 0,06

Los datos representan la media ± el error estándar de 4-5 determinaciones. * Indica diferencias estadísticamente significativas con el control sin inocular según el test a posteriori de Dunnet (p 0,05). Referencias: PA, parte aérea; PF, peso fresco; PS, peso seco.

Los resultados indicaron que todos los tratamientos analizados fueron capaces de promover un aumento significativo en el peso fresco aéreo y radical, en la longitud aérea y en el peso seco de la parte aérea de las plantas. Por otra parte, sólo un tratamiento (el correspondiente a la inoculación con *Pseudomonas*) fue capaz de incrementar significativamente el peso seco radical en comparación con el control sin inocular. Los resultados obtenidos sugieren que los aislamientos son capaces de expresar una o más de las características PGPR determinadas *in vitro* en coinoculación con otros aislamientos y en presencia de la planta. El incremento de los parámetros de biomasa observado en los tratamientos es importante porque sugiere mayor crecimiento vegetal, que probablemente se traduzca en un mejor rendimiento al momento de la cosecha. Además, un aumento en este tipo de parámetros es interesante en el marco de una agricultura que implique sistemas de siembra directa, ya que una mayor biomasa vegetal significa mayor aporte de materia orgánica a los suelos.

En conjunto, los datos obtenidos en este ensayo indican la capacidad de los aislamientos para promover el crecimiento vegetal cuando son inoculados en grupos conformados según su afiliación taxonómica. Teniendo en cuenta el interesante

potencial observado en los mismos, se decidió realizar un segundo ensayo en el cual cada uno de los aislamientos fue inoculado individualmente sobre las plántulas de maíz.

Inoculación individual de los aislamientos en plántulas de maíz

En este segundo ensayo, se realizó la inoculación por separado de los aislamientos sobre plántulas de maíz. El objetivo fue evaluar si el efecto promotor del crecimiento observado en el ensayo anterior puede ser atribuido a los aislamientos individuales o a la interacción sinérgica de los mismos en el consorcio microbiano. Los tratamientos analizados fueron los siguientes:

1. Inoculación de *Klebsiella sp.* TT001
2. Inoculación de *Klebsiella sp.* NTI31
3. Inoculación de *Enterobacter sp.* NONC13
4. Inoculación de *Enterobacter sp.* NMAN11
5. Inoculación de *Pseudomonas sp.* NVAM24
6. Inoculación de *Pseudomonas sp.* NCHA33
7. Inoculación de *Pseudomonas sp.* NCHA35
8. Control fertilizado (regado con solución de nitrato 5 mM).
9. Control negativo (sin inocular).

Los resultados obtenidos indicaron que la inoculación de algunos aislamientos incrementó diferentes parámetros de crecimiento vegetal (Tabla 5). Estas diferencias también fueron observadas a simple vista, evidenciándose el mayor tamaño de las plántulas correspondientes a algunos tratamientos (Figura 6).

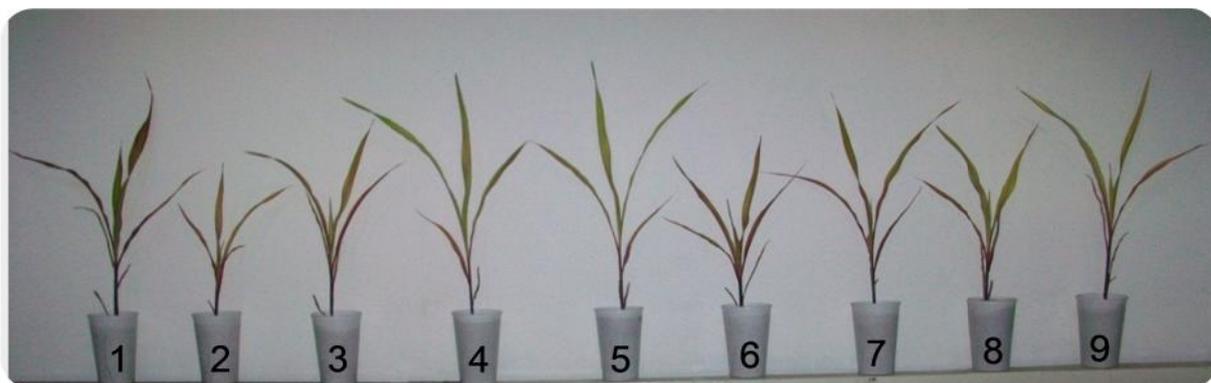


Fig 6. Aspecto de las plántulas de maíz inoculadas. Referencias: 1, Control fertilizado; 2, Control negativo; 3, *Klebsiella* sp. TT001; 4, *Pseudomonas* sp. NCHA33; 5, *Klebsiella* sp. NTI31; 6, *Enterobacter* sp. NMAN11; 7, *Enterobacter* sp. NONC13; 8, *Pseudomonas* sp. NCHA35; 9, *Pseudomonas* sp. NVAM 24.

Tabla 5. Parámetros de crecimiento de las plántulas de maíz inoculadas.

Tratamiento	PF AÉREO (g)	PF RADICAL (g)	PS AÉREO (g)	PS RADICAL (g)	LONGITUD AÉREA (cm)
<i>Enterobacter</i> NMAN11	1,95 ± 0,11	5,57 ± 0,25*	0,46 ± 0,04	0,37 ± 0,04	29,54 ± 0,81
<i>Enterobacter</i> NONC13	2,70 ± 0,25*	5,32 ± 0,37	0,52 ± 0,07	0,61 ± 0,05	39,47 ± 1,74*
<i>Klebsiella</i> NTI31	2,70 ± 0,14*	5,07 ± 0,15	0,49 ± 0,03	0,48 ± 0,04	44,15 ± 1,4*
<i>Klebsiella</i> TT001	2,61 ± 0,17*	5,70 ± 0,23*	0,59 ± 0,05*	0,67 ± 0,02	37,06 ± 1,57*
<i>Pseudomonas</i> NVAM24	2,50 ± 0,15*	5,13 ± 0,37	0,49 ± 0,03	0,62 ± 0,04	36,00 ± 1,06*
<i>Pseudomonas</i> NCHA33	2,81 ± 0,20*	4,67 ± 0,14	0,48 ± 0,04	0,44 ± 0,03	46,07 ± 1,65*
<i>Pseudomonas</i> NCHA35	2,16 ± 0,17	5,62 ± 0,30*	0,45 ± 0,04	0,71 ± 0,07	29,85 ± 1,70
Control fertilizado	4,51 ± 0,33*	7,09 ± 0,39*	0,8 ± 0,06*	0,95 ± 0,05*	44,17 ± 1,16*
Control sin inocular	1,71 ± 0,12	4,57 ± 0,41	0,35 ± 0,03	0,68 ± 0,04	27,10 ± 0,85

Los valores representan el promedio de 8-9 determinaciones ± el error estándar. * indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al control no inoculado según el test a posteriori de Dunnet (p 0,05). Referencias: PF, Peso Fresco; PS, Peso Seco.

Numerosos tratamientos, incluyendo la inoculación con *Enterobacter* sp. NONC13, *Klebsiella* sp. NTI31, *Klebsiella* sp. TT001, *Pseudomonas* sp. NVAM24 y *Pseudomonas* sp. NCHA33, fueron capaces de incrementar el peso fresco de la

parte aérea de las plántulas de maíz. Por otra parte, los tratamientos *Enterobacter* sp. NMAN11, *Klebsiella* sp. TT001 y *Pseudomonas* sp. NCHA35 incrementaron significativamente el peso fresco radical de las plántulas. Sin embargo, este efecto no se observó cuando se analizaron las variables peso seco aéreo y peso seco radical. Sólo un tratamiento, *Klebsiella* sp. TT001, fue capaz de incrementar significativamente el peso seco de la parte aérea; mientras que ningún aislamiento fue capaz de aumentar significativamente el peso seco radical. Por otra parte, los tratamientos *Enterobacter* sp. NONC13, *Klebsiella* sp. NTI31, *Klebsiella* sp. TT001, *Pseudomonas* sp. NVAM24 y *Pseudomonas* sp. NCHA33 aumentaron significativamente la longitud de la parte aérea de las plántulas. Como era esperable, el control fertilizado con nitrógeno demostró un incremento estadísticamente significativo con respecto al control sin inocular en todas las variables analizadas.

En conjunto, los datos indican que la inoculación individual de algunos aislamientos es capaz de incrementar el crecimiento de las plántulas de maíz. Sin embargo, comparando los resultados con los obtenidos en las coinoculaciones por grupos bacterianos, se deduce que esta última estrategia es más eficiente en la promoción del crecimiento. Así, por ejemplo, la coinoculación con bacterias del género *Enterobacter* incremento el peso fresco de la parte aérea en un 118%, mientras que la inoculación con el aislamiento *Enterobacter* sp. NONC13 lo hizo solo en un 57%. Esto sugiere la existencia de un efecto sinérgico entre los aislamientos, que favorece la expresión de las características PGPR cuando son coinoculados.

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS

Posteriormente, se analizó la capacidad de los aislamientos de la colección para localizarse como endófitos dentro de las raíces de las plantas de maíz. La capacidad endofítica permite a los microorganismos expresar determinadas propiedades promotoras del crecimiento de manera eficiente y, además, ofrece a los microorganismos un nicho más estable que el suelo, favoreciendo su persistencia en el agroecosistema.

Para ello, las raíces de maíz fueron esterilizadas superficialmente y luego maceradas en un mortero estéril. El macerado fue sembrado en medio TY con el agregado de Cloranfenicol. Se realizó un recuento de las colonias obtenidas en este medio y, posteriormente, los aislamientos fueron caracterizados genotípicamente mediante ERIC-PCR para confirmar su identidad. La capacidad endofítica de los aislamientos fue evaluada en los dos ensayos presentados anteriormente, la coinoculación y la inoculación individual de los mismos en las plántulas de maíz.

Análisis de la capacidad endofítica de los aislamientos en el ensayo de coinoculación

Se realizó un recuento de las colonias bacterianas obtenidas a partir del macerado de raíces provenientes de plantas coinoculadas con los aislamientos. Los resultados obtenidos a partir del recuento indicaron que los morfotipos bacterianos que podrían corresponder a los aislamientos inoculados estaban presentes como endófitos en cantidades que variaron entre 10^3 y 10^5 UFC/g raíz (Tabla 6).

Tabla 6. Recuento de morfotipos bacterianos endofíticos compatibles con los aislamientos inoculados.

Tratamiento	Recuento (UFC/g raíz)
<i>Enterobacter</i>	$3,3.10^5 \pm 3,0.10^5$
<i>Klebsiella</i>	$2,2.10^3 \pm 0,2.10^3$
<i>Pseudomonas</i>	$1,2.10^5 \pm 0,8.10^5$

Los datos representan la media \pm error estándar de 3 determinaciones.

Posteriormente, se realizó la caracterización genotípica de los mismos mediante ERIC-PCR (Figuras 7, 8 y 9). Los perfiles ERIC pueden ser considerados como huellas genéticas, que permiten la identificación molecular de aislamientos. En este trabajo, la técnica de ERIC-PCR fue utilizada para confirmar que los aislamientos obtenidos a partir del interior radical correspondían a las cepas previamente inoculadas.

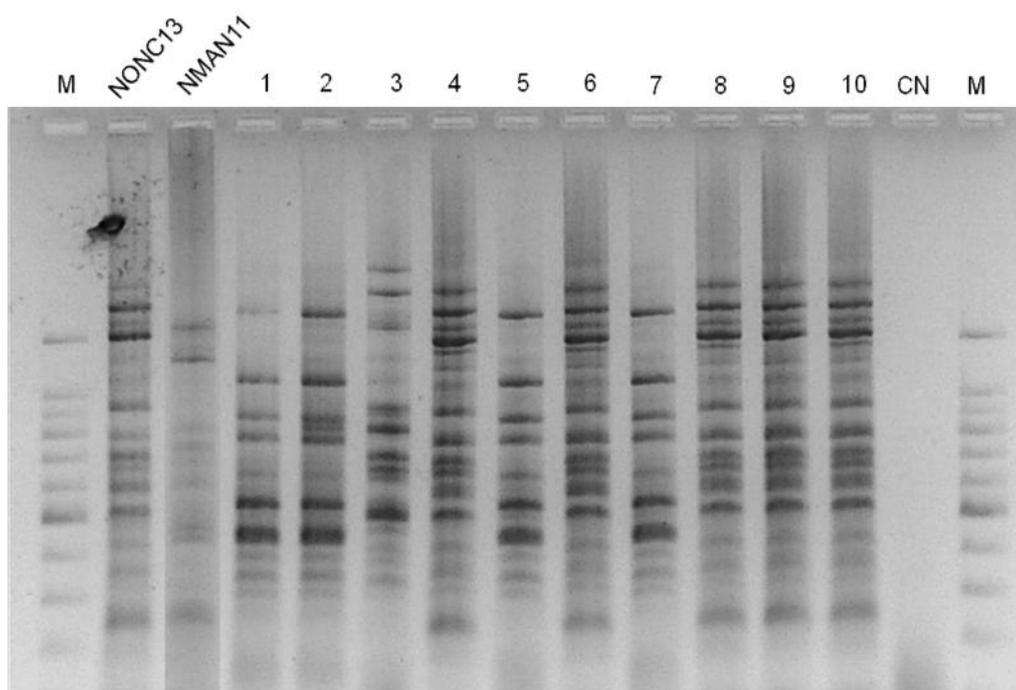


Fig 7. Perfiles ERIC de las cepas de *Enterobacter* y de los aislamientos obtenidos como endófitos de plantas de maíz. M: marcador de Peso molecular de 100 pb; CN: control negativo de la reacción. Las calles indicadas con números del 1 al 10 corresponden a perfiles ERIC de aislamientos endofíticos.

Los resultados permitieron determinar que los aislamientos endofíticos denominados como 4, 6, 8, 9 y 10 poseen perfiles genéticos idénticos a los de la cepa *Enterobacter* sp. NONC13. Por otra parte, no se encontraron aislamientos que posean perfiles ERIC idénticos a los del aislamiento *Enterobacter* sp. NMAN11. Además, fue posible reconocer aislamientos endofíticos que poseen perfiles genéticos diferentes a los de las cepas inoculadas.

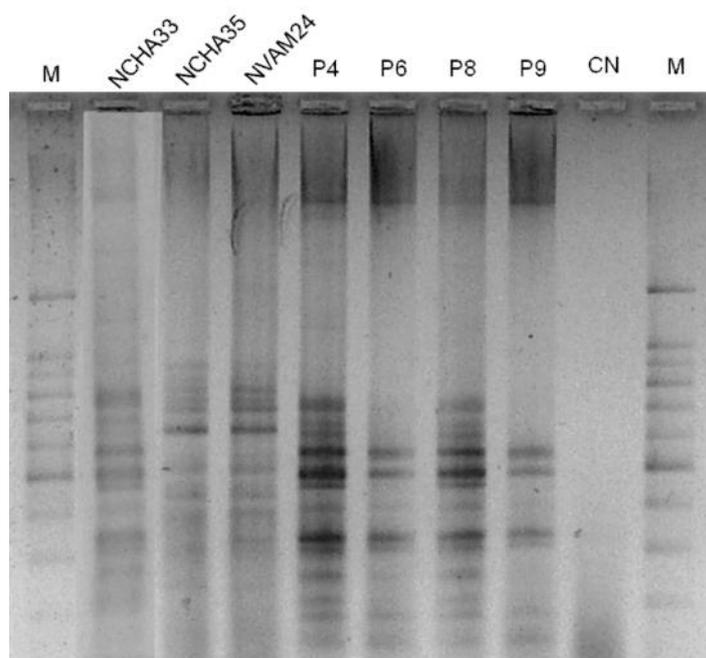


Fig 8. Perfiles ERIC de las cepas de *Pseudomonas* y de los aislamientos obtenidos como endófitos de plantas de maíz. M: marcador de Peso molecular de 100 pb; CN: control negativo de la reacción. Las calles indicadas con las denominaciones P4, P6, P8 y P9 corresponden a perfiles ERIC de aislamientos endofíticos.

Los resultados indicaron que los aislamientos denominados P4 y P8 poseen perfiles genéticos idénticos a los de la cepa *Pseudomonas* sp. NCHA33. Por otra parte, no se encontraron aislamientos que presenten perfiles ERIC correspondientes a los de *Pseudomonas* sp. NCHA35 y *Pseudomonas* sp. NVAM24. Además, fue posible reconocer aislamientos endofíticos que poseen perfiles genéticos diferentes a los de los aislamientos inoculados.

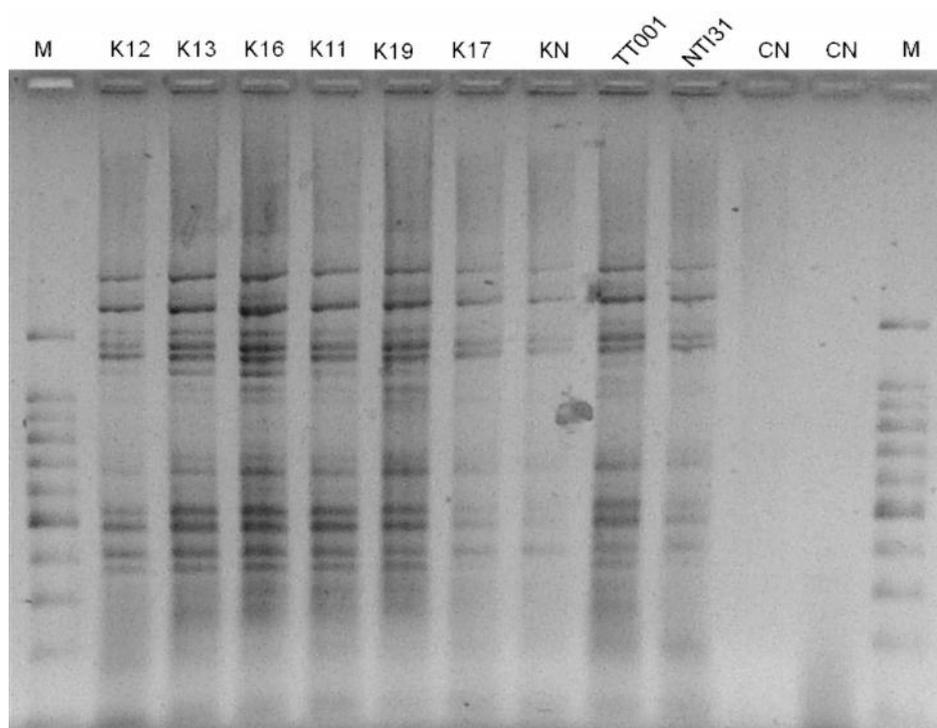


Fig 9. Perfiles ERIC de las cepas de *Klebsiella* y de los aislamientos obtenidos como endófitos de plantas de maíz. M: marcador de Peso molecular de 100 pb; CN: control negativo de la reacción. Las calles indicadas con las denominaciones K12, K13, K16, K11, K19, K17 y KN corresponden a perfiles ERIC de aislamientos endofíticos.

En este caso particular, los perfiles ERIC de los aislamientos *Klebsiella* TT001 y *Klebsiella* NTI31 comparten un gran número de bandas y resulta difícil diferenciarlos. Los resultados indicaron que los aislamientos obtenidos a partir del interior de las raíces poseen perfiles ERIC idénticos a los de los aislamientos inoculados. Sin embargo, no fue posible atribuir los aislamientos endofíticos obtenidos a una de las cepas inoculadas en particular.

Tomados en conjunto, los resultados indicaron que los aislamientos *Enterobacter* sp. NONC13, *Pseudomonas* sp. NCHA33, *Klebsiella* TT001 y/o *Klebsiella* NTI31 son capaces de localizarse como endófitos de las raíces de las plántulas de maíz. Por otra parte, resulta interesante destacar la presencia de aislamientos con perfiles genéticos diferentes a los de los inoculados. Considerando que el sustrato utilizado se encuentra estéril, y que las semillas de maíz fueron esterilizadas superficialmente, estos aislamientos bacterianos probablemente se encuentren como endófitos de la semilla utilizada. Teniendo en cuenta que estas bacterias

endofíticas pueden poseer diferentes propiedades (promotoras del crecimiento vegetal, patogénicas para vegetales, humanos, etc.), y las grandes distancias a las que pueden trasladarse las semillas, esta información resulta relevante para el estudio de la diseminación de los microorganismos endófitos y sus potenciales métodos de control.

Análisis de la capacidad endofítica de los aislamientos en el ensayo de inoculación individual

Posteriormente, se analizó el potencial endofítico de los aislamientos en el ensayo de inoculación individual. Al igual que en el ensayo anterior, en un primer momento se realizó un recuento de colonias bacterianas obtenidas a partir del macerado de raíces de plantas esterilizadas superficialmente (Tabla 7).

Tabla 7. Recuento de morfotipos bacterianos endofíticos compatibles con los aislamientos inoculados.

Aislamiento	Recuento (UFC/g raíz)
<i>Klebsiella</i> sp. TT001	$5,45 \cdot 10^3 \pm 5,35 \cdot 10^3$
<i>Klebsiella</i> sp. NTI31	$3,77 \cdot 10^3 \pm 2,49 \cdot 10^3$
<i>Enterobacter</i> sp. NONC13	$4,49 \cdot 10^2 \pm 3,16 \cdot 10^2$
<i>Enterobacter</i> sp. NMAN11	$6,89 \cdot 10^2 \pm 1,36 \cdot 10^2$
<i>Pseudomonas</i> sp. NVAM24	$2,00 \cdot 10^2 \pm 0,14 \cdot 10^2$
<i>Pseudomonas</i> sp. NCHA33	$1,89 \cdot 10^3 \pm 1,46 \cdot 10^3$
<i>Pseudomonas</i> sp. NCHA35	$1,35 \cdot 10^3 \pm 1,01 \cdot 10^3$

Los datos representan la media \pm error estándar de 3 determinaciones.

Los datos indicaron que las raíces albergan una población de bacterias endofíticas en cantidades que varían entre 10^2 y 10^3 UFC/g raíz. Luego se utilizó la técnica de ERIC-PCR para confirmar la identidad de los aislamientos obtenidos (Figuras 10, 11, 12 y 13).

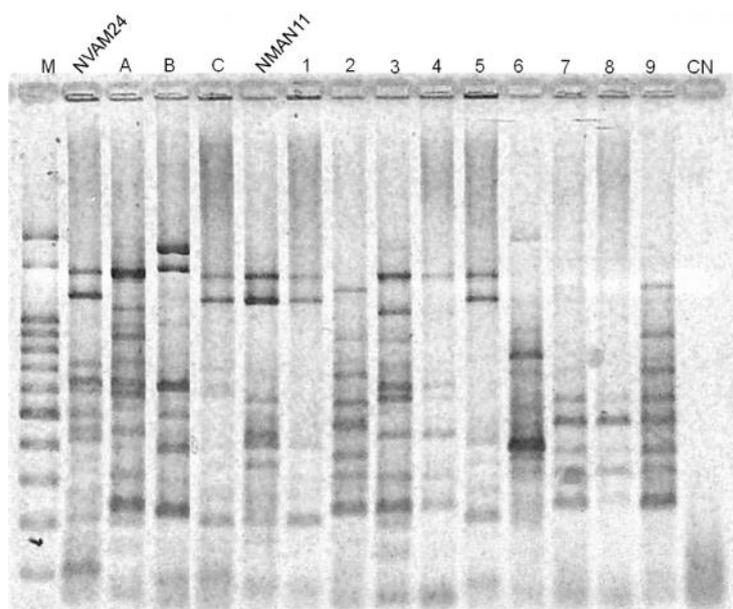


Fig 10. Perfiles ERIC de los aislamientos inoculados y obtenidos a partir de plantas de maíz tratadas con *Pseudomonas* sp. NVAM24 y *Enterobacter* sp. NMAN11. M: marcador de Peso molecular de 100 pb; CN: Control negativo de la reacción. Calles A-C: perfiles ERIC de aislamientos endofíticos obtenidos a partir de plantas inoculadas con *Pseudomonas* sp. NVAM24; calles 1-9: perfiles ERIC de aislamientos obtenidos a partir de plantas inoculadas con *Enterobacter* sp. NMAN11.

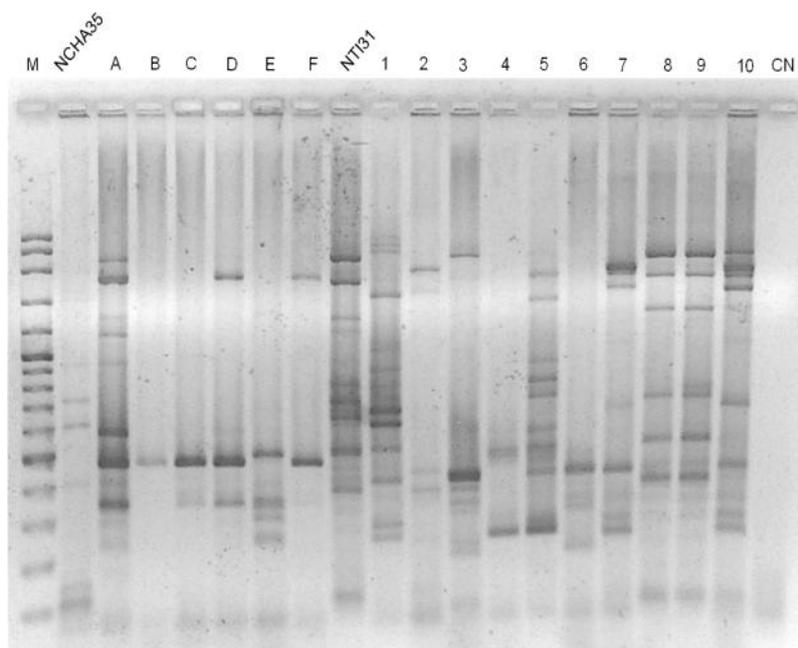


Fig 11. Perfiles ERIC de los aislamientos inoculados y obtenidos a partir de plantas de maíz tratadas con *Pseudomonas* sp. NCHA35 y *Klebsiella* sp. NTI31. M: marcador de Peso molecular de 100 pb; CN: Control negativo de la reacción. Calles A-F: perfiles ERIC de aislamientos endofíticos obtenidos a partir de plantas inoculadas con *Pseudomonas* sp. NCHA35; calles 1-10: perfiles ERIC de aislamientos obtenidos a partir de plantas inoculadas con *Klebsiella* sp. NTI31.

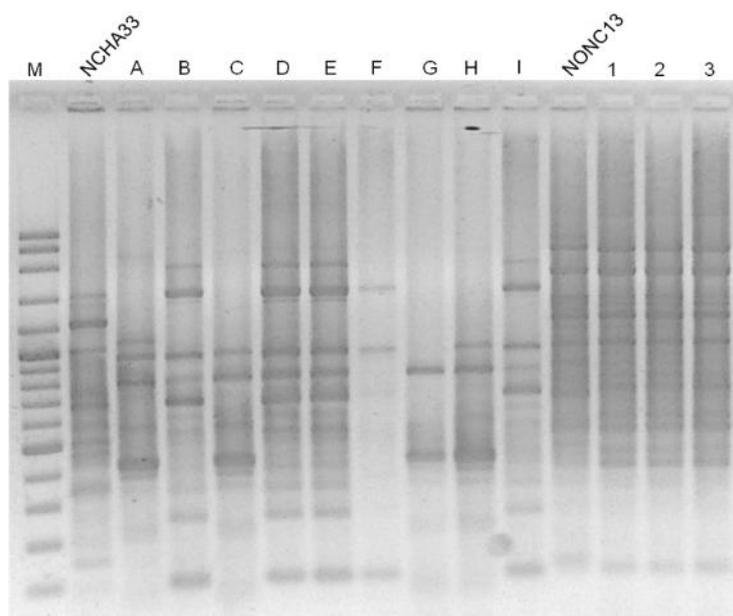


Fig 12. Perfiles ERIC de los aislamientos inoculados y obtenidos a partir de plantas de maíz tratadas con *Pseudomonas* sp. NCHA33 y *Enterobacter* sp. NONC13. M: marcador de Peso molecular de 100 pb. Calles A-I: perfiles ERIC de aislamientos endofíticos obtenidos a partir de plantas inoculadas con *Pseudomonas* sp. NCHA33; calles 1-3: perfiles ERIC de aislamientos obtenidos a partir de plantas inoculadas con *Enterobacter* sp. NONC13.

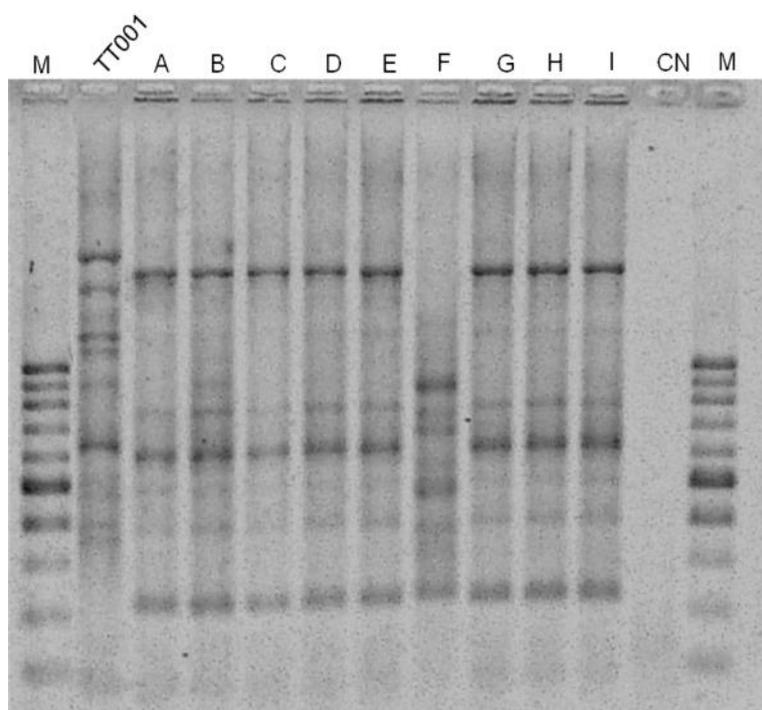


Fig 13. Perfiles ERIC de los aislamientos inoculados y obtenidos a partir de plantas de maíz tratadas con *Klebsiella* sp. TT001. M: marcador de Peso molecular de 100 pb, CN: Control negativo de la reacción. Calles A-I: perfiles ERIC de aislamientos endofíticos obtenidos a partir de plantas inoculadas con *Klebsiella* sp. TT001.

Los resultados obtenidos revelaron la presencia de aislamientos con perfiles genéticos diferentes a los de los inoculados, y que sólo *Enterobacter* sp. NMAN11 y *Enterobacter* sp. NONC13 poseen la capacidad de localizarse como endófitos. Estos resultados difieren de los obtenidos para el ensayo anterior (coinoculaciones en grupos según la afiliación taxonómica), en el cual *Enterobacter* sp. NONC13, *Pseudomonas* sp. NCHA33, *Klebsiella* TT001 y/o *Klebsiella* NTI31 habían demostrado su capacidad para localizarse como endófitos de las raíces de las plántulas de maíz. Ésto indica que la capacidad de invadir y establecerse endofíticamente en las raíces es un fenómeno complejo, que depende de la expresión de múltiples factores bacterianos y vegetales. Sin embargo, tomados en conjunto, los resultados indican que *Enterobacter* sp. NMAN11, *Enterobacter* sp. NONC13, *Pseudomonas* sp. NCHA33, *Klebsiella* TT001 y/o *Klebsiella* NTI31 poseen la capacidad para colonizar el interior de las raíces de las plántulas de maíz.

Relacionando los datos de promoción del crecimiento con capacidad endofítica, podemos identificar aislamientos como *Pseudomonas* sp. NCHA33, que es capaz de colonizar el interior vegetal y, además, puede promover eficientemente el crecimiento de las plantas. Por otra parte, *Enterobacter* sp. NONC13 también posee potencial endofítico, sin embargo no es capaz de promover el crecimiento de manera eficiente. Estos datos indican que no existe una relación directa entre la capacidad endofítica de los aislamientos y efecto promotor del crecimiento. Por lo tanto, la capacidad endofítica de los aislamientos no parece ser relevante para el efecto promotor del crecimiento en maíz. Sin embargo, dicha capacidad puede representar una estrategia ecológica relacionada con la persistencia de los microorganismos en el ecosistema, ya que permite la colonización de un nicho ecológico más estable que el suelo e inaccesible para otros componentes de la microbiota.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta el momento, se decidió realizar un ensayo que involucre una secuencia de rotación de cultivos maní-maíz. En este ensayo se evaluaron los efectos de la expresión de las características promotoras del crecimiento de los aislamientos sobre los dos cultivos. Además, dado que los aislamientos fueron inoculados al inicio de la rotación, también se evaluó su capacidad para sobrevivir en el agroecosistema, quedando disponibles para promover el crecimiento del cultivo siguiente.

ANÁLISIS DE LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO EN UN ENSAYO DE ROTACIÓN DE CULTIVOS MANÍ-MAÍZ

En este ensayo, se cultivaron en macetas (conteniendo como sustrato suelo estéril deficiente en fosfatos) plantas de maní coinoculadas con el simbionte *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 y los aislamientos endofíticos agrupados por género por el término de 80 días, momento en el que ocurre la senescencia nodular. El objetivo es que los nódulos senescentes liberen en el suelo los microorganismos que se albergan en su interior (incluyendo los aislamientos no simbioses endófitos de nódulos). Luego, las plantas de maní fueron cosechadas, y se evaluaron diferentes parámetros simbióticos y agronómicos (Tabla 8). Además, teniendo en cuenta que el grupo de bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* demostró mayor capacidad para solubilizar fosfatos, resultó de interés analizar la contribución relativa de esta propiedad al crecimiento vegetal. Para ello, se incluyó en este ensayo un tratamiento conformado por la coinoculación entre *Bradyrhizobium* sp SEMIA 6144 y *Pseudomonas* que fue regado con una solución de fosfato insoluble (fosfato tricálcico). El efecto de las inoculaciones pudo evidenciarse a simple vista, diferenciándose el mayor tamaño y el color verde intenso de las plantas inoculadas con respecto a las plantas sin inocular (Figura 14).



Fig 14. Aspecto de las plantas de maní. Referencia: inoculación con: 1, *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 + *Enterobacter*; 2, *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144; 3, *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 + *Pseudomonas*; 4, *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 + *Klebsiella* (regados con Hoagland sin nitrógeno y sin fósforo); 5, *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 + *Pseudomonas* (regado con Hoagland conteniendo fosfato insoluble); 6, control negativo (sin inocular).

Tabla 8. Parámetros de crecimiento de las plántulas de maní inoculadas.

	PF PA (g)	PF Radical (g)	Long. Aérea (cm)	PS PA (g)	PS Radical (g)	Número de nódulos/ Planta
Semia 6144	178,00 ± 7,55*	66,60 ± 3,37	30,12 ± 0,96*	4,09 ± 0,15*	1,23 ± 0,09	325,60 ± 8,23
SEMIA 6144 + <i>Pseudomonas</i> con P insoluble	170,89 ± 7,02	70,33 ± 3,59	32,29 ± 0,66*	4,10 ± 0,14*	1,36 ± 0,08*	372,30 ± 23,27
SEMIA 6144 + <i>Pseudomonas</i>	182,87 ± 7,05*	85,75 ± 1,81*‡	32,50 ± 0,50*	4,13 ± 0,17*	1,54 ± 0,07*	355,00 ± 17,00
SEMIA 6144 + <i>Klebsiella</i>	177,89 ± 9,54*	73,10 ± 3,47	28,20 ± 0,35	4,12 ± 0,21*	1,70 ± 0,09*‡	401,11 ± 16,00
SEMIA 6144 + <i>Enterobacter</i>	171,75 ± 14,30	71,00 ± 5,44	29,44 ± 0,9*	4,28 ± 0,21*	1,24 ± 0,07	267,87 ± 31,40
Control sin inocular	137,80 ± 6,16	65,67 ± 1,94	24,78 ± 0,29	3,28 ± 0,15	1,08 ± 0,06	0 ± 0

Los valores representan el promedio de 8-9 determinaciones ± el error estándar. † Indica incremento significativo con respecto al tratamiento con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 según el test a posteriori de Dunnett (p 0,05). * indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al control no inoculado según el test a posteriori de Dunnett (p 0,05). Referencias: PA, Parte aérea; PF, Peso Fresco; PS, Peso Seco.

Los resultados obtenidos en este ensayo confirmaron la capacidad de los aislamientos para promover el crecimiento de las plántulas de maní. Se destacan los tratamientos conformados por la inoculación entre *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 y *Klebsiella*, así como la coinoculación entre el bradirizobio y *Pseudomonas*, capaces de incrementar distintos parámetros de crecimiento con respecto al control sin inocular. Además, estos tratamientos resultan interesantes porque son capaces de aumentar significativamente parámetros de crecimiento en comparación con la inoculación de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 (cepa recomendada como inoculante). Finalmente, es preciso destacar que la inoculación de los aislamientos no afecta negativamente el proceso de nodulación llevado a cabo por el bradirizobio.

Por otra parte, no se observó contribución significativa de la solubilización de fosfatos al crecimiento vegetal, ya que no se evidenciaron diferencias significativas en las variables medidas para los tratamientos *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 + *Pseudomonas* con o sin la adición de fosfato tricálcico. Esto puede deberse a que el cultivo de maní no requiere elevados niveles de fósforo para crecer, pudiendo desarrollarse en suelos que, al menos para otros cultivos, son deficitarios en este nutriente (Bonadeo y Moreno, 2006).

Posteriormente, se determinó el número de microorganismos inoculados originalmente que permanecían viables en el suelo luego de la cosecha de las plantas de maní (Tabla 9).

Tabla 9. Recuento de microorganismos viables por gramo de suelo.

TRATAMIENTO	RECuento DE COLONIAS (UFC/g de suelo)
<i>Klebsiella</i>	$1,19 \cdot 10^5 \pm 0,59 \cdot 10^5$
<i>Pseudomonas</i>	$1,01 \cdot 10^5 \pm 0,71 \cdot 10^5$
<i>Enterobacter</i>	$7,90 \cdot 10^5 \pm 6,04 \cdot 10^5$
<i>Pseudomonas</i> con fosfato	$3,70 \cdot 10^4 \pm 1,36 \cdot 10^4$

Los datos representan la media \pm error estándar de 3 determinaciones.

Los resultados obtenidos indican que las bacterias son capaces de sobrevivir en el suelo, encontrándose en cantidades que varían entre 10^4 y 10^5 UFC/g.

Posteriormente, semillas de maíz fueron sembradas en las mismas macetas en las que habían sido crecidas las plantas de maní. Tres macetas por tratamiento fueron reinoculadas con los aislamientos de la colección, de modo de incrementar su número en el sustrato. Las plantas se mantuvieron por un lapso de 30 días. Finalmente, se cosecharon y evaluaron diferentes parámetros de crecimiento vegetal (Tabla 10). Además, el efecto de los tratamientos pudo ser observado a simple vista, evidenciándose el mayor tamaño y el color más intenso de su follaje en algunos tratamientos (Figura 15).

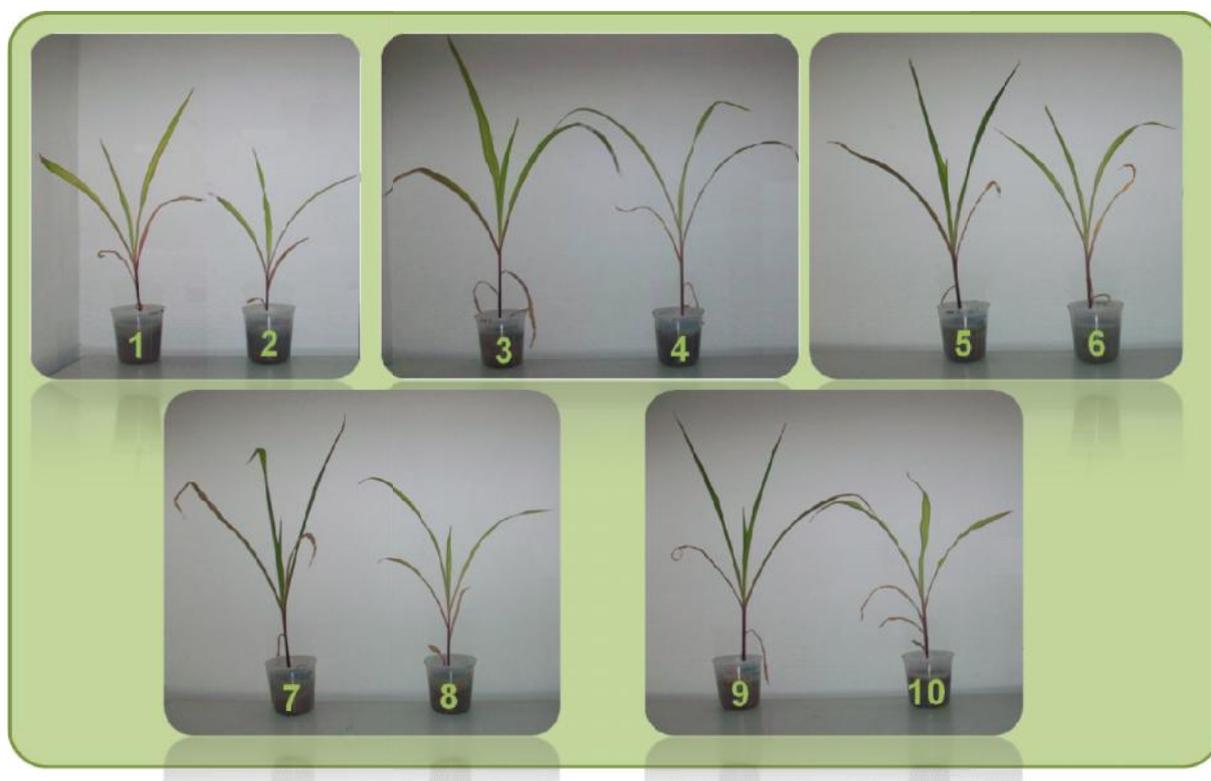


Fig. 15. Aspecto de las plantas de maíz. Referencia: 1, *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144; 2, Control sin inocular; 3, *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 + *Enterobacter* (reinoculada); 4, *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 + *Enterobacter*; 5, *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 + *Klebsiella* (reinoculada); 6, *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 + *Klebsiella*; 7, *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 + *Pseudomonas* (reinoculada); 8, *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 + *Pseudomonas*; 9, *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 + *Pseudomonas* regada con fostato insoluble (reinoculada); 10, *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 + *Pseudomonas* regada con fostato insoluble.

Análisis de propiedades promotoras del crecimiento de maní (Arachis hypogaea L.) y maíz (Zea mays L.) de bacterias endófitas de nódulos de maní. Potencial aplicación a sistemas de rotación de cultivos

Tabla 10. Parámetros de crecimiento vegetal de plántulas de maíz.

Tratamiento	PF PA (g)	PF Rad (g)	LA (cm)	PS PA (g)	PS Rad (g)
Semia 6144	4,40 ± 0,37*	5,22 ± 0,33	60,12 ± 1,50*	0,81 ± 0,09	0,99 ± 0,05
SEMIA 6144 + Pseudomonas c/P	4,88 ± 0,27*	4,72 ± 0,27	55,50 ± 2,13	0,91 ± 0,06*	0,89 ± 0,04
SEMIA 6144 + Pseudomonas reinoculadas c/P	11,33 ± 0,54*‡	8,67 ± 0,27*‡	65,83 ± 1,20*‡	2,54 ± 0,37*‡	1,63 ± 0,16*‡
SEMIA 6144 + Pseudomonas	4,18 ± 0,11	5,24 ± 0,30	58,30 ± 0,84*	0,78 ± 0,04	1,06 ± 0,11
SEMIA 6144 + Pseudomonas reinoculadas	8,67 ± 0,52*‡	9,03 ± 0,62*‡	61,17 ± 1,59*	1,77 ± 0,12*‡	1,84 ± 0,14*‡
SEMIA 6144 + Klebsiella	5,18 ± 0,35*	5,18 ± 0,46	62,33 ± 1,7*‡	0,85 ± 0,06	1,21 ± 0,12
SEMIA 6144 + Klebsiella reinoculadas	9,67 ± 0,87*‡	9,17 ± 0,69*‡	65,17 ± 3,4*‡	1,92 ± 0,16*‡	2,09 ± 0,23*‡
SEMIA 6144 + Enterobacter	5,66 ± 0,22*‡	5,86 ± 0,30	64,40 ± 1,50*‡	1,20 ± 0,07*‡	1,20 ± 0,14
SEMIA 6144 + Enterobacter reinoculadas	9,77 ± 0,32*‡	9,77 ± 0,26*‡	64,17 ± 1,70*‡	1,82 ± 0,06*‡	1,80 ± 0,03*‡
Ctrol sin inocular	3,46 ± 0,14	4,50 ± 0,22	51,06 ± 1,46	0,65 ± 0,03	0,93 ± 0,06

El resultado representa la media ± EE. * Indica diferencias estadísticamente significativas con el control negativo (Dunnet, p 0,05). ‡ Indica incremento significativo con respecto al tratamiento con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 según el test a posteriori de Dunnet (p 0,05). Referencias: LA, Longitud aérea; PA, parte aérea; PF, peso fresco; PS, peso seco; Rad: Radical. Los tratamientos denominados *Pseudomonas* con P se refieren a que fueron regados con fosfato tricálcico (insoluble) como única fuente de fosfatos.

Los resultados indicaron que numerosos tratamientos fueron capaces de incrementar significativamente distintos parámetros de crecimiento vegetal. Es interesante destacar que todos los tratamientos que implicaron reinoculaciones

mostraron un incremento significativo en las variables medidas con respecto al control sin inocular. Con respecto al peso fresco aéreo, además de las reinoculaciones, la inoculación individual de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 y su coinoculación con *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Pseudomonas* (regada con fosfatos insoluble) mostraron diferencias significativas en comparación con el control sin inocular. En cuanto a la longitud aérea, todos los tratamientos reinoculados, así como también la inoculación individual de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 y su coinoculación con *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Pseudomonas* (regada con fosfato soluble) mostraron diferencias significativas con respecto al control sin inocular. Por otra parte, sólo los tratamientos reinoculados y la coinoculación de SEMIA6144 con *Pseudomonas* (con fosfato insoluble) y con *Enterobacter* fueron capaces de incrementar significativamente el peso fresco radical. Finalmente, sólo los tratamientos que implicaron reinoculaciones fueron capaces de aumentar significativamente el peso seco radical.

De manera interesante, varios tratamientos incrementaron significativamente algunos parámetros de crecimiento con respecto al tratamiento *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144. Así, todos los tratamientos que involucraron reinoculaciones fueron capaces de aumentar significativamente el peso seco y fresco radical y aéreo. Además, todos ellos, excepto *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 + *Pseudomonas*, incrementaron significativamente la longitud aérea. El tratamiento conformado por *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 + *Enterobacter* (no reinoculado) aumentó significativamente la longitud y el peso seco y fresco aéreo, mientras que *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 + *Klebsiella* (no reinoculado) solo incrementó significativamente la longitud aérea de las plántulas de maíz.

Para evaluar la contribución relativa de la solubilización de fosfatos al crecimiento de maíz, se analizaron los valores obtenidos para la coinoculación entre *Bradyrhizobium* sp SEMIA 6144 y *Pseudomonas* (regado con una solución de fosfato tricálcico) y el mismo tratamiento pero regado sin fosfatos. Nuevamente, no se observó un aporte significativo de la solubilización de fosfatos para el crecimiento vegetal, ya que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores de las variables en tratamientos equivalentes (plantas reinoculadas con P vs reinoculadas sin P y sin reinocular con P vs sin reinocular sin P).

En conjunto, los datos indican que los efectos promotores más interesantes se observan en aquellas plantas que fueron reinoculadas, ya que todos los tratamientos reinoculados mostraron una diferencia significativa en las variables determinadas en comparación con el control sin inocular. Además, todas las reinoculaciones mostraron diferencias estadísticamente significativas con su correspondiente tratamiento sin reinocular para las variables Peso Fresco Radical y Aéreo y Peso Seco Radical y Aéreo, demostrando un efecto sustancial de la reinoculación.



Conclusiones

- Los aislamientos de la colección de endófitos de nódulos de maní presentan diferentes propiedades PGPR. Todos los aislamientos presentaron capacidad para solubilizar fosfatos y producir AIA. Además, los aislamientos *Pseudomonas* sp. NCHA35, *Pseudomonas* sp. NVAM24 y *Klebsiella* sp. TT001 produjeron sideróforos. Es interesante destacar que todos los aislamientos de la colección presentaron, al menos, una de las características PGPR analizadas.
- Los aislamientos de la colección fueron capaces de promover el crecimiento de plántulas de maíz, ya sea coinoculados en grupos conformados según su afiliación taxonómica o inoculados individualmente. Sin embargo, los efectos observados en las coinoculaciones fueron mayores, sugiriendo la existencia de un efecto sinérgico entre los aislamientos.
- Los aislamientos *Enterobacter* sp. NMAN11, *Enterobacter* sp. NONC13, *Pseudomonas* sp. NCHA33, *Klebsiella* sp. TT001 y/o *Klebsiella* sp. NTI31 fueron capaces de colonizar el interior de las raíces de las plántulas de maíz. Sin embargo, la capacidad endofítica de los aislamientos no parece ser relevante para el efecto promotor del crecimiento en maíz.
- Las bacterias analizadas demostraron un interesante potencial para promover el crecimiento de plántulas de maní y maíz en un ensayo de rotación. A pesar de ser capaces de persistir en los suelos, la reinoculación con los aislamientos luego de la cosecha de maní demostró ser una práctica más efectiva para la promoción del crecimiento del cultivo de maíz.
- Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el conjunto de los ensayos realizados, podemos afirmar que la coinoculación entre *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 y *Klebsiella*, y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 y *Pseudomonas* representan una alternativa interesante para su utilización en sistemas agrícolas que impliquen rotación de cultivos maní-maíz. Sin embargo, es importante comprobar la capacidad PGPR de estos aislamientos en ensayos a campo.



Bibliografía

- ✓ Alexander, M. 1980. Transformaciones microbianas del fósforo. En: Introducción a la microbiología del suelo. AGT Editor, México. Pp. 355-371.
- ✓ Alvarez, R.; Nissen, S. J.; Sutter, E. 1989. Relationship between indol-3-acetic acid levels in apple (*Malus pumila Mill*). Rootstocks cultured in vitro and adventitious root formation in the presence of indol-3-butiric acid. *Plant Physiology*. 89: 439-443.
- ✓ Arndt, W.; Kolle, C.; Buchenauer, H. 1998. Effectiveness of fluorescent *Pseudomonads* on cucumber and tomato plants under practical conditions and preliminary studies on the mode of action of the antagonists. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 105, 198-215.
- ✓ Babalola, O. O.; Osir, E. O.; Sanni, A. I.; Odhiambo, G. D.; Bulimo, W. D. 2003. Amplification of 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic (ACC) deaminase from plant growth promoting rhizobacteria in *Striga*-infested soil. *African Journal of Biotechnology*, 2, 157-160.
- ✓ Bai, Y.; Aoust, F. D.; Smith, D.; Driscoll, B. 2002. Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. *Can J Microbiol*. 48: 230-238.
- ✓ Bar- Ness, E.; Chen, L.; Hadar, Y.; Marschner, H.; Römheld, V. 1991. Siderophores of *Pseudomonas putida* as an iron for dicot and monocot plants. En: iron nutrition and interactions in plants. Edited by Y. Chen and Hadar. Klumber Academic Publishers, the Netherlands. Pp. 271-281.
- ✓ Bar- Ness, E.; Hadar, Y.; Shanzer, A.; Libman, J. 1992. Iron uptake by plants from microbial siderophores. A study with 7- nitrobenz – 2oxa -1, 3 –diazole – desferrioxamine as fluorescent ferrioxamine B analog. *Plant Physiol*. 99:1329-1335.
- ✓ Bashan, Y.; de-Bashan, L. E. 2005. Bacteria/Plant growth promotion. En: Encyclopedia of soils in the environment. Oxford, UK, Elsevier. 1: 103-115.
- ✓ Batjes, N. H. 1997. A world data set of derived soil properties by FAO-UNESCO soil unit for global modeling. *Soil Use Manage*. 13: 9-16.
- ✓ Benhizia, Y.; Benhizia, H.; Benguedouar, A.; Muresu, R.; Giacomini, A.; Squartini, A. 2004. *Gamma proteobacteria* can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Syst. Appl. Microbiol*. 27: 462-468.
- ✓ Benitez, T.; Rincón, A.; Limón, M.; Codón, A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol*. 7: 249-260.
- ✓ Beringer. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol*. 84: 188-198.
- ✓ Bertand, H.; Nalin, R.; Bally, R.; Cleyet-Marel, J. C. 2001. Isolation and identification of the most efficient plant growth-promoting bacteria associated with canola (*Brassica napá*). *Biology and Fertility of Soils*. 33: 152-156.
- ✓ Bolwerk, A.; Lagopodi, A.; Wijffjes, A.; Lamers, G.; Chin-A-Woeng, T.; Lugtenberg, B.; Bloemberg, G. 2003. Effects of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. radidis. *Mol. Plant/Microbe Interact*. 16: 983-993.
- ✓ Bonadeo, E.; Moreno, I. 2006. Nutrición mineral. En: El cultivo de maní en Córdoba. Fernandez y Giayetto (compiladores). Ed. Universidad Nacional de Río Cuarto.

- ✓ Bonaterra, A.; Ruz, L.; Badosa, E.; Pinochet, J.; Montesinos, E. 2003. Growth promotion of *Prunus* rootstocks by root treatment with specific bacterial strains. *Plant and Soil*. 255: 555-569.
- ✓ Braun, V.; Hantke, K. 1997. En: transition metals in microbial metabolism. Eds. Winkelmann, G. y Carrano, C. J. Harwood, Amsterdam. Pp. 81-101.
- ✓ Brick J. M.; Bostock R.M.; Silverstone S.E. 1991. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Appl. Environ- Microbiol.* 57: 535-538.
- ✓ Cámara Argentina del maní. Outlook del cluster manisero argentino. Disponible en http://www.camaradelmani.com.ar/es/INFORME-COMPLEJO-MANI_ok.pdf. Consultado en Octubre de 2012.
- ✓ Cerda Castillo, E. 2008. Aislamiento de Micromonospora de nódulos de leguminosas tropicales y análisis de su interés como promotor del crecimiento vegetal. Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca.
- ✓ Cezon, R.; Manero, F. J.; Gutierrez, P. A.; Ramos, B.; Garica, J. A. L. 2003. Effects of two plant growth-promoting rhizobacteria on the germination and growth of pepper seedlings (*Capsicum annum*) cv. Roxy. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 49: 593-603.
- ✓ Chabot, R.; Antoun, H.; Cescas, M. C. 1996. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium legonumisarum* biovar *phaseoli*. *Plant Soil*. 184: 311-321.
- ✓ Chin-A-Woeng, T.; Bloemberg, G.; Lugtenberg, B. 2003. Mechanism of biological control of phytopathogenic fungi by *Pseudomonas* spp. En: *Plant-Microbe Interactions*. Vol. 6, Stacey G and Keen N. Eds. St. Paul, USA. The American. Phytopathol. Soc. Pp: 173-225.
- ✓ Cholaky, L. ; Giayetto, O. ; Neuman, E. ; Cavaignac, S. 1993. Respuestas del maní (*Arachis hypogaea* L.) a la inoculación del suelo con *Rhizobium* spp. *Revista de la UNRC*. 3: 173-179.
- ✓ Compant, S. ; Duffy, B. ; Nowak, J. ; Clément, C. ; Ait Barka, E. 2005. Minireview: Use of plant growth promoting bacteria for biocontrol of plant disease: principles, mechanisms of action and future prospects. *Appl. and Environ. Microbiol.* 71: 4951-4959.
- ✓ Crichton, R. R.; Charlotheaux-Wauters, M. 1987. Iron transport and storage. *Europ. J. Biochem.* 164: 485-506.
- ✓ Crowley, D. E.; Reid, C. P. P.; Szanislo, P. L. 1988. Utilization of microbial siderophores in iron acquisition by oat. *Plant Physiol.* 87: 680-685.
- ✓ Curtis, H.; Barnes, N. S. 1994. Biología, quinta edición revisada. Editorial Médica Panamericana. Cap: 16: 342- 358.
- ✓ de Bruijn, F. J. 1992. Use of repetitive (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 Lajudie, P.; Willems, A.; Nick, G.; Mohamed, S. H.; Torck, U.; Coopman, R.; Filali-Maltouf, A.; Kersters, K.; Dreyfus, B.; Lindstrom, K.; Gillis, M. 1999. *Agrobacterium* bv. 1 strain isolated from nodules of tropical legumes. *Syst. Appl. Microbiol.* 22: 119-132.
- ✓ Dey, R.; Pal, K. K.; Bhatt, D. M.; Chauhan, S. M. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research.* 159: 371-394.
- ✓ Esitken, A.; Karlidag, H.; Ercisli, S.; Turan, M.; Sahin, F. 2003. The effect of spraying a growth promoting bacterium on the yield, growth and nutrient element composition of leaves of apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. Hacihaliloglu). *Australian Journal of Agricultural Research*, 54, 377-380.
- ✓ Fabra, A.; Castro, S.; Taurian, T.; Angelini, J.; Ibañez, F.; Dardanelli, M.; Tonelli, M.; Bianucci, E.; Valetti, L. 2010. Interaction among *Arachis hypogaea* L. (peanut) and beneficial soil microorganisms: how much is it known? *Crit Rev Microbiol.* 36(3):179-94.
- ✓ Fernandez E. M.; Giayetto, O. 2006. El cultivo de maní en Córdoba. Universidad Nacional de Río Cuarto. Primera Edición.
- ✓ Frioni, L. 1999. Procesos microbianos. Ed. Fundación de la UNRC. Tomo II. Pág. 273.
- ✓ Galiant, W. C. 1988. The origin of corn. En: G. F. Sprague y J. W. Dudley (eds.). *Corn and corn improvement (3º Ed.)* Series agronomy N° 18. American Society of Agronomy, Inc. Publishers. Madison, Wisconsin, USA.
- ✓ Gao, J.; Terefework, Z.; Lindstrom, K. 2001. Genetic diversity of rhizobia isolated from *Astragalus adsurgens* growing in different geographical regions of China. *J Biotechnol.* 91: 155-168.
- ✓ Garica, J. A. L.; Schloter, M.; Durkaya, T.; Hartmann, A.; Manero, F. J. G. 2003. Colonization of pepper roots by a plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* strain. *Biology and Fertility of Soils*, 37, 381-385.
- ✓ Giandana, E. 1997. El cultivo de maní: cultivares. En: Manual de maní. Segunda edición. Estación experimental agropecuaria Manfredi (INTA).
- ✓ Giayetto, O. ; Cerioni, G. ; Asnal, W. ; Cisneros, J. 1998. III Reunión Nacional de Oleginosas, Bahía Blanca, Argentina.
- ✓ Glick, B R.; Karaturovic, D.M.; y Newell, P. C. 1995. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads. *Canadian Journal of Microbiology.* 41: 533-536.
- ✓ Goldstein, A. H. 1995. Recent progress in understading the molecular genetics and biochemistry phosphate solubilization by gram negative bacteria. *Biological Agriculture and Horticulture.* Vol 12.
- ✓ Goodman, M. M. 1988. The history and evolution of maize CRC cristal review. *Plant science.* 7: 197-220.
- ✓ Gordon, S. A.; Weaver, R. P. 1951. *Plant Physiol.* 26: 192-195.

- ✓ Greenshields, L. D.; Guosheng, L.; Feng, J.; Selvaraj, G.; Wei, Y. 2007. The siderophore biosynthetic gene SID1, but not the ferroxidase gene FET3, is required for full *Fusarium graminearum* virulence. *Mol. Plant Pathol.* 8: 411-421.
- ✓ Guevara, E. La simulación del desarrollo, crecimiento y rendimiento en maíz. En: <http://www.fertilizando.com/articulos/SimulacionDesarrolloCrecimientoyRendimientoEnMaiz.pdf>. Consultado en Octubre de 2012.
- ✓ Gupta, S.; Arora, D. K.; Srivastava, A. K. 1995. Growth promotion of tomato plants by rhizobacteria and imposition of energy stress on *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry*, 27, 1051-1053.
- ✓ Hallmann, J.; Quadt-Hallmann, A.; Rodríguez-K'abana, R.; Kloepper, J. W. 1998. Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. *Soil Biol Biochem* 30: 925–937.
- ✓ Hamaouri, B.; Abbadi, J. M.; Burdman, S.; Rashid, A.; Sarig, S.; Okon, Y. 2001. Effects of inoculation with *Azospirillum brasilense* on chickpeas (*Cicer arietinum*) and faba beans (*Vicia Faba*) under different growth conditions. *Agronomie*. 21: 553-560.
- ✓ Harrington, J. M.; Crumbliss, A. L. 2009. The redox hypothesis in siderophore-mediated iron uptake. *Biometals*. 22: 679-689.
- ✓ Hartmann, G.; Howell, C.; Viterbo, A.; Chet, A.; Lorito, M. 2004. *Trichoderma* Species- Opportunistic, Avirulent Plant Symbionts. *Nat Rev Microbiol.* 2:43-56.
- ✓ Heath, M. E.; Metcalfe, D. S.; Barnes, R. F. 1973. Eds. Forages. 3rd ed. Iowa State University Press. Ames, Iowa. Pp. 755.
- ✓ Hoagland, D. R.; Arnon, D. I. 1950. Water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* 347.
- ✓ Ibañez, F.; Angelini, J.; Taurian, T.; Tonelli, M. L.; Fabra, A. 2009. Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic Gammaproteobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 32: 49–55.
- ✓ Ibañez, F.; Taurian, T.; Angelini, J.; Tonelli, M.; Fabra, A. 2008. Rhizobia phylogenetically related to common bean symbionts *Rhizobium giardinii* and *R. tropici* isolated from peanut nodules in central Argentina. *Soil. Biol. Biochem.* 40: 537–539.
- ✓ Jaizme-Vega, M. D. C.; Rodríguez-Romero, A. S.; Guerra, M. S. P. 2004. Potential use of rhizobacteria from the *Bacillus* genus to stimulate the plant growth of micropropagated bananas. *Fruits*, 59, 83-90.
- ✓ Jeffries, P.; Gianinazzi, S.; Perotto, S.; Turnan, K.; Barea, J. M. 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biol. Fertil. Soils* 37: 1-16.
- ✓ Joo, G. J.; Kim, Y. M.; Lee, I. J.; Song, K. S.; Rhee, I. K. 2004. Growth promotion of red pepper plug seedlings and the production of gibberellins by *Bacillus cereus*, *Bacillus macroides* and *Bacillus pumilus*. *Biotechnology Letters*, 26, 487-491.

- ✓ Kan, F. L.; Chen, Z. Y.; Wang, E. T.; Tian, C. F.; Sui, X. H.; Chen, W. X. 2007. Characterization of symbiotic and endophytic grown in Quinghai Tibet Plateau and in other zones of China. Arch. Microbiol. 188: 103-115.
- ✓ Khalid, A.; Arshad, M.; Zahir, Z. A. 2003. Growth and yield response of wheat to inoculation with auxin producing PGPR. Pakistan Journal of Botany. 35: 483-498.
- ✓ Kim, K. Y.; Jordan, D.; Krishnan H.D. 1997. *Rahnella aqualitis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxiapatite. FEMS Microbiol. Lett. 153: 273-277.
- ✓ Kloepper, J. W.; Leong, J.; Teintze, M.; Schroth, M. N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. Nature. 286: 885-886.
- ✓ Kloepper, J. W.; Zablokovicz, R. M.; Tipping, E. M.; Lifshitz, R. 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In D. L. Keister y P. B. Cregan (Eds.). The rhizosphere and plant growth pp. 315-326. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- ✓ Kloepper, J.; Ryu, C.; Zhang, S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytophatol. 94:1259-1266.
- ✓ Kokalis-Burelle, N.; Vavrina, C. S.; Roskopf, E. N.; Shelby, R. A. 2002. Field evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria amended transplant mixes and soil solarization for tomato and pepper production in Florida. Plant and Soil. 2: 257-266.
- ✓ Kpamblekou, K.; Tanatanai, M. A. 1994. Effect of organic acids release of phosphorous from phosphate rocks. Soil. Sic. 158: 442-453.
- ✓ Kris-Etheron, P. M.; Hu, F. B.; Ros, E.; Sabatè, J. 2008. The role of tree nuts and peanuts in the prevention of coronary heart disease: multiple potential mechanisms. J Nurt 138: 1746S-1751S.
- ✓ Lavicoli, A.; Boutet, E.; Buchala, A.; Metraux, J. 2003. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Mol. Plant-Microbe Interact. 16:851-858.
- ✓ Lei, X.; Wang, E. T.; Chen, W. F.; Sui, X. H.; Chen, W. X. 2008. Diverse bacteria isolated from root nodules of wild Vicia species grown in temperate region of China. Arch. Microbiol. 190: 657-71.
- ✓ Li, J. H.; Wang, E. T.; Chen, W. F.; Chen, W. X. 2008. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Helionjiang province of China. Soil. Boil. Biochem. 40: 238-246.
- ✓ Liu, J.; Wang, E. T.; Chen, W. X. 2005. Diverse rhizobia associated with woody legumes *Wisteria sinensis*, *Cercis racemosa* and *Amorpha fruticosa* grown in the temperate zone of China. Syst. Appl. Microbiol. 28: 465-477.
- ✓ Loper, J. E.; Buyer, J. S. 1991. Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. Mol. Plant-Microbe Interact. 4: 5-13.
- ✓ Mehta, S.; Nautiyal, Ch. Sh. 2001. An Efficient Method for Qualitative Screening of Phosphate-Asolubilizing Bacteria. Current Microbiol. 43: 51-56.

- ✓ Meuwley, P.; Pilet, P. E. 1991. Local treatment with indol-3-acetic acid induces differential growth responses in *Zea mays* L roots. *Planta* 185: 58-64.
- ✓ Mhamdi, R.; Laguerre, G.; Aouani, M. E.; Amarge, N. 2002. Different species and symbiotic genotypes of field rhizobia can nodulate *Phaseolus vulgaris* in Tunisian soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 41: 77-84.
- ✓ Mirza, M. S.; Ahmad, W.; Latif, F.; Haurat, J.; Bally, R.; Normajid, P.; Malik, K. A. 2001. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micropropagated sugarcane in vitro. *Plant and Soil.* 237: 47-54.
- ✓ Moss, J. P.; Ramanatha Rao, V. 1995. The peanut-reproductive development to plant maturity. In: eds. H. E. Pattee and H. T. Stalke, *Advances in Peanut Science*. Am. Peanut Res. and Educ. Soc., Inc., Stilwater, OK. 1-13.
- ✓ Munir, A.; Munir, I.; Afrasyab, S.; Hasnain, S. 2003. Growth stimulatory effects of *Azospirillum* strains on *Triticum aestivum* and *Vigna radiata*. *Biotechnology*, 2, 198-205.
- ✓ Murphy, J. F.; Reddy, M. S.; Ryu, C. M.; Kloepper, J. W.; Li, R. 2003. Rhizobacteria-mediated growth promotion of tomato leads to protection against Cucumber Mosaic Virus. *Phytopathology*, 93, 1301-1307.
- ✓ Nanda-Kumar, R.; Babu, S.; Viswanathan, R.; Sheela, J.; Raguchander, T.; Samiyappan, R. 2001. A new bio-formulation containing plant growth promoting rhizobacterial mixture for management of sheath blight and enhanced grain yield in rice. *Biocontrol*, 46, 493-510.
- ✓ Newbold, P. 1989. The use of nitrogen fertilizer in agriculture: where do we go practically and ecologically? *Plant and Soil.* 115:297.
- ✓ Nielsen Neindam, M.; Sørensen, J.; Fels, J.; Pedersen, H. C. 1998. Secondary metabolite and endochitinase dependent antagonisms toward plant pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* isolates from sugar beet rhizosphere. *Appl. and Environm. Microbiol.* 64: 3563-3569.
- ✓ Ortas, L. 2008. El cultivo del maíz: fisiología y aspectos generales. Agrigan SA boletín Nº 7.
- ✓ Palaniappan, P.; Chauhan, P. S.; Saravanan, V. S.; Anandham, R.; Sa, T. 2010. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza sp.* *Biol. Fert. Soils.* 46: 807-816.
- ✓ Pan, B.; Bai, Y. M.; Leibovitch, S.; Smith, D. L. 1999. Plant growth-promoting rhizobacteria and kinetin as ways to promote corn growth and yield in a short-growing-season area. *European Journal of Agronomy.* 11: 179-186.
- ✓ Patten, C. L.; Glick, B. R. 1996. Bacterial biosynthesis of indol-3-acetic acid. *Canadian Journal Microbiology.* 42: 207-220.
- ✓ Peck, S. C.; Kende, H. 1995. Sequential induction of the ethylene biosynthetic enzymes by indol-3-acetic acid in etiolated peas. *Plant and Molecular Biology.* 28: 33-38.
- ✓ Pereira, P., Ibáñez, F., Rosenblueth, M., Etcheverry, M., Martínez-Romero, E. 2011. Analysis of the Bacterial Diversity Associated with the Roots of Maize (*Zea mays* L.) through Culture-dependent and Culture-independent Methods". *ISRN Ecology*. doi:10.5402/2011/938546.

- ✓ Pilet, P. E.; Saugy, M. 1987. Effect on root growth of endogenous and applied IAA and ABA. A critical re-examination. *Plant Physiology*. 83: 33-38.
- ✓ Ping, L.; Boland, W. 2004. Signals from the underground, bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Sciences*. 9: 263-266.
- ✓ Preeti, V.; Reddy, M. S.; Kavitha, S.; Velusamy, P.; PaulRaj, R. S. D.; Purushothaman, S. M.; Priyadarisini, V. B.; Bharathkumar, S.; Kloepper, J. W.; Gnanamanickam, S. S. 2002. Role of biological preparations in enhancement of rice seedling growth and grain yield. *Current Science*, 83, 1140-1143.
- ✓ Raghothama, K. G.; Karthikeyan, A. S. 2005. Phosphate acquisition. *Plant and Soil*. 274: 37-49.
- ✓ Rai, R.; Dash, P.; Prasanna, B. M.; Singh, A. 2007. Endophytic bacterial flora in the stem tissue of a tropical maize (*Zea mays* L.) genotype: isolation, identification and enumeration. *World J Microbiol Biotechnol*. 23: 853–858.
- ✓ Raj, N. S.; Shetty, N. P.; Shetty, H. S. 2004. Seed bio-priming with *Pseudomonas fluorescens* isolates enhances growth of pearl millet plants and induces resistance against downy mildew. *International Journal of Pest Management*, 50, 41-48.
- ✓ Rajendran, G.; Sing, F.; Desai, A. J.; Archana, G. 2008. Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by co-inoculation of *Bacillus* strain with *Rhizobium spp.* *Bioresour Technol*. 99: 4544-4550.
- ✓ Rending, V. V.; Taylor, H. M. 1989. *Principles of Soil-Plant Interrelationships*. P. 20. New York: McGraw-Hill.
- ✓ Reyes, I. Alvarez, L. El-Ayuobi H. Valery A. 2008. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro* vol 20 (1). Páginas 37-48.
- ✓ Reymond, P.; Farmer, E. 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol*. 5: 404-411.
- ✓ Richardson, A. E. 1994. Soil microorganismos and phosphorus availability. In *Soil Biota, Management in Sustainable Farming System*. Eds. C. e. Pankhurst, B. M. Doube, V. V. S. R. Gupts and P. R. Pp. 50-62. CSIRO, Melbourne, Australia.
- ✓ Rodriguez, H.; Fraga, R. 1990. Phosphate solubilizing bacteria and their role in the plant growth promotion. *Biotech. Adv*. 17: 319-339.
- ✓ Rojas-Avelizapa, L. I.; Cruz-Camarillo, R.; Guerrero, M. I.; Rodríguez-Vázquez, R.; Ibarra, J. E. 1999. Selection and characterization of proteo-chitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis*, able to grow in shrimp waste media. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 15: 299-308.
- ✓ Runge-Metzger, A. 1995. In *Phosphorus in the Global Environment: Transfers, cycles, and Management*. Ed. H. Tiessen. Pp. 27-42. John Wiley and Sons, NY.
- ✓ Salisbury F. B. 1994. The role of plant hormones. In *plant – Environment Interactions*. Ed. R. E. wilkinson pp 39-81. Marcel Dekker. New York. USA.

- ✓ Schwyn, B.; Neilands, J. 1987. Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores. *Analytical Biochemistry*. 160: 47-56.
- ✓ Shishido, M.; Petersen, D. J.; Massicotte, H. B.; Chanway, C. P. 1996. Pine and spruce seedling growth and mycorrhizal infection after inoculating with plant growth promoting *Pseudomonas* strains. *FEMS Microbiology Ecology*. 21: 109-119.
- ✓ Sorensen, J. 1997. The rhizosphere as a habitat for soil microorganisms. In J. D. van Elsas, J. T. Trevors y E. M. H. Wellington (Eds.). *Modern Soil Ecology* pp. 21-46. New York: Marcel Dekker, Inc.
- ✓ Stajkovi , O.; De Meyer, S.; Mili i , B.; Willems, A.; Deli , D. 2009. Isolation and characterization of endophytic non-rhizobial bacteria from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Bot. Serb.* 33: 107-114.
- ✓ Stalker, H. T. 1997. Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Field Crops Research Elsevier*. 53: 205-217.
- ✓ Stevenson, F. J.; Cole, M. A. 1999. *Cycles of soil: Carbon, Nitrogen, Phosphorous, Sulfur, Micronutrients*. 2nd Edition. New York: Wiley.
- ✓ Sturz, A. V.; Christie, B. R.; Metheson, B. G.; Nowak, J. 1997. Biodiversity of endophytic bacteria wich colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biol Fertil Soils* 25: 13-19.
- ✓ Summerfield, R. J.; Bunting, A. H. 1980. Eds. *Advances in legume science*. Royal Botanic Gardens, Kew, England. Pp. 667.
- ✓ Taiz, L.; Zeiger, E. 1991. *Plant physiology*. The Benjamin-Cumming Publishing Company. Inc. Pp. 559.
- ✓ Taurian, T., Anzuay, S.; Angelini, J.; Tonelli, M.; Ludueña, L.; Pena, D.; Ibañez, F.; Fabra, A. 2010. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. *Plant and soil*; 329: 421 – 431.
- ✓ Taurian, T.; Aguilar, O. M.; Fabra, A. 2002. Characterization of nodulating peanut rhizobia isolated from a native soil population in Córdoba, Argentina. *Symbiosis*. 33: 59–72.
- ✓ Thien, S. J.; Myers, R. 1992. Plant growth substances produced by *A. brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L). *Appl. Environment Microbiol.* 37: 1016-1024.
- ✓ Tilak, K. V. B. R.; Ranganayaki, N.; Pal, K. K.; De, R.; Saxena, A. K.; Nautiyal, C. S.; Mittal, S.; Tripathi, A. K.; Johri, B. N. 2005. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science*, 89, 136-150.
- ✓ Tokala, R. K.; Strap, J. L.; Jung, C. M.; Crawford, D. L.; Hamby Salove, M.; Deobald, L. A.; Bailey, F.; Morra, M. J. 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2161-2171.

- ✓ Tripathi, M.; Munot, H. P.; Schouche, Y.; Meyer, J. M.; Goel, R. 2005. Isolation and functional characterization of siderophore-producing lead- and cadmium-resistant *Pseudomonas putida* KNP9. *Current Microbiology*, 50, 233-237.
- ✓ Trujillo, M. E.; Alonso-Vega, P.; Rodríguez, R.; Carro, L.; Cerda, E.; Alonso, P.; Martínez-Molina, E. 2010. The genus *Micromonospora* is widespread in legume root nodules: the example of *Lupinus angustifolius*. *ISME Journal*. 4: 1265–1281.
- ✓ Van Rossum, D.; Muyotche, A.; Verseveld, H. W. 1994. Siderophore production by *Bradyrhizobium* spp. strain nodulating groundnut. *Plant and Soil*. 163: 177-187.
- ✓ Vance, C.P.; Graham, P. H.; Allan, Deborah L. 2000. Biological nitrogen fixation: phosphorus a critical need? In: Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. Proceedings of the 12th International Congress on Nitrogen Fixation. Foz do Iguazu, Paraná, Brazil. Pp. 509.
- ✓ Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255: 571-586.
- ✓ Vincent, J. M. 1970. *Manual Práctico de Rhizobiología*. Ed. Hemisferio Sur.
- ✓ Vincent, J. M.; Whitney, A. S.; Bose, J. 1977. Exploiting the legume *Rhizobium* symbiosis in tropical agriculture. Univ. Hawaii. Coll. Trop. Agric. Misc. Publ. Pp. 145.
- ✓ Vinuesa. 1998. Genetic and phenotypic analysis of *Rhizobium etli* and *R. tropici* mutants defective in lipopolysaccharide sintesis and acid tolerante, and applications of genomic typing methods. Tesis doctoral. Marburg, Alemania.
- ✓ 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(4):506-13.
- ✓ Wandersman, C.; Delepelaire, P. 2004. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu. Rev. Microbiol*. 58: 611-647.
- ✓ Wang, L. L.; Wang, E. T.; Liu, J.; Chen, W. X. 2006. Endophytic occupation by *Agrobacterium tumefaciens* of root nodules and roots of *Melilotus dentatus*. *Microbial Ecol* (in press).
- ✓ Wang, Y.; Brown, H. N.; Crowley. D. E.; Szaniszló, P. J. 1993. Evidence for direct utilization of a siderophore, ferrioxamine B, in axenically grown cucumber. *Plant Cell Environ*. 16: 579-585.
- ✓ Watson, S. A. 1988. Corn marketing, processing and utilization. En: G. F. Sprague y J W Dudley. Eds. *Corn and corn improvement*. 3^o Ed. Series agronomy N^o 18. American Society of Agronomy, Inc. Publishers. Madison, Wisconsin, USA.
- ✓ Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Jour. of Exp. Bot*. 52: 487-511.
- ✓ Zahir, A.; Muhammad, A.; Frankenberger Jr., W. T. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. *Advances in Agronomy*. 81: 97-168.
- ✓ Zakhia, F.; Jeder, H.; Willems, A.; Gillis, M.; Dreyfus, B.; de Lajudie, P. 2006. Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for *nifH*-like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. *Microbial. Ecol*. 51: 375-393.