

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE CIENCIAS

MONTEVIDEO, URUGUAY

2013

**Efecto de la inoculación con
bacterias diazótroficas en plantas
de maíz (*Zea mays* L.) de
distintas variedades**

Estudiante: Pamela Gutiérrez Sena

Tutora: Dra. Andrea Rodríguez Blanco

Laboratorio de Microbiología Vegetal, Dpto Biología Vegetal, Facultad de Agronomía,
UDELAR.

AGRADECIMIENTOS

Por sobre todo le doy Gracias a Dios por todas las bendiciones que me ha dado, por estar siempre conmigo y porque sin él no soy nada. A quienes me han sido imprescindibles y me apoyaron cada día mis Padres, mis hermanos y a mi novio Fran, no tengo palabras para agradecer todo lo que han hecho. Gracias a toda mi familia. A todo el equipo del Laboratorio de Microbiología por el apoyo en incontables ocasiones: Andrea, Pilar, Gabriela, German, Gastón, Victoria, Silvina y Tania.

RESUMEN

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cultivos cerealeros de mayor importancia a nivel mundial. En Uruguay, el área de siembra se ha incrementado en los últimos años. Para la producción del maíz se emplean altos niveles de fertilización nitrogenada, menos del 50% del fertilizante aplicado es utilizado por la planta, lo que culmina en la contaminación de los suelos, el aire y los recursos hídricos. Entre los microorganismos capaces de promover el crecimiento vegetal se encuentran las bacterias diazótrofes que realizan el proceso de fijación biológica de N₂ (FBN). La FBN es una alternativa con alto potencial para disminuir o sustituir la fertilización química del maíz. El Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Agronomía cuenta con una colección de diazótrofes aislados de maíz que fueron caracterizados por su capacidad de fijar N₂, producir AIA (ácido indol-3-acético), y solubilizar fosfato. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inoculación con bacterias diazótrofes seleccionadas en dos variedades de maíz (PAU871 y NK940). Las 8 cepas en estudio presentaron capacidad de producir celulasas y pectinasas y también de inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* *in vitro*. Los ensayos de inoculación demostraron que existe especificidad en la interacción cepa-variedad. La variedad de maíz PAU871 presentó mayor respuesta a la inoculación que NK940. La inoculación con la cepa 10R *Raoultella terrigena* produjo un aumento significativo en la biomasa aérea de las plantas de maíz tanto en condiciones gnotobióticas como en macetas con suelo. La inoculación con los diazótrofes en estudio produjo cambios en el número de diazótrofes rizosféricos pero no en el número de endófitos de raíces. La técnica de T-RFLP mostró que en la variedad PAU871, la inoculación con la cepa 10R produjo cambios en la estructura de la comunidad de diazótrofes endófitos, mientras que las comunidades de diazótrofes rizosféricos de plantas inoculadas y controles presentaron elevada similitud entre ellas.

Palabras clave: maíz (*Zea mays* L.), diazótrofes, inoculación, número más probable, análisis por T-RFLP.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 El cultivo del maíz.....	1
1.2 El nitrógeno como nutriente vegetal y la fertilización nitrogenada.....	2
1.3 Microorganismos promotores del crecimiento vegetal.....	3
1.4 Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN).....	6
1.5 Microorganismos fijadores de nitrógeno.....	8
1.6 Inoculantes y Biofertilizantes.....	9
1.7 Métodos para evidenciar los efectos de la inoculación en plantas.....	13
2. OBJETIVOS.....	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1 Bacterias diazotófas.....	19
3.2 Actividad celulasa y pectinasa.....	20
3.3 Capacidad de inhibición del crecimiento de <i>Fusarium oxysporum in vitro</i>	20
3.4 Efecto de un curasemillas en el crecimiento de las cepas.....	21
3.5 Efecto de la inoculación sobre la elongación de la radícula.....	21
3.6 Efecto de la inoculación en plantas de maíz crecidas condiciones gnotobióticas.....	22
3.7 Efecto de la inoculación con distintas concentraciones de inóculo en plantas de maíz creciendo, con y sin fertilización nitrogenada.....	22
3.8 Efecto de la inoculación en plantas de maíz crecidas en macetas con suelo.....	23
3.9 Recuento de fijadores de nitrógeno por número más probable.....	24
3.10 Estructura de la comunidad de diazótrofos en plantas de la variedad PAU871 mediante la técnica de TRFLP.....	25
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
4.1 Actividad celulolítica y pectinolítica.....	28
4.2 Capacidad de inhibir el crecimiento del hongo <i>Fusarium oxysporum in vitro</i>	30

4.3 Efecto de un curasemillas en el crecimiento de las cepas.....	31
4.4 Efecto de la inoculación sobre la elongación de la radícula.....	33
4.5 Efecto de la inoculación en el crecimiento de plantas de maíz.....	35
4.5.1 Ensayo con plantas crecidas en condiciones gnotobióticas.....	35
4.5.2 Efecto de la concentración del inóculo en el crecimiento de plantas de maíz creciendo con y sin fertilización nitrogenada.....	38
4.5.3 Ensayo con plantas de maíz crecidas en macetas con suelo.....	41
4.5.3.1 Promoción del crecimiento vegetal.....	41
4.5.3.2 Recuento de fijadores de nitrógeno en plantas de maíz de distintas variedades inoculadas con bacterias seleccionadas.....	42
4.5.3.3 Estructura de la comunidad de diazotrofos en plantas de la variedad PAU871 mediante la técnica de T-RFLP.....	47
5. CONCLUSIONES.....	53
6. PERSPECTIVAS.....	55
7. ANEXO.....	56
8. BIBLIOGRAFIA.....	58

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El cultivo del maíz

Las plantas como maíz, arroz y trigo pertenecen a la familia Poaceae y forman parte de la alimentación básica de aproximadamente 6,5 billones de personas en el mundo (Bhattacharjee *et al.*, 2008). La necesidad de incrementar la producción y obtener mayores rendimientos de estos cultivos crece paralelamente al crecimiento exponencial de la población.

El maíz ocupa el tercer lugar en el mundo, después del trigo y el arroz en cuanto a área cosechada y producción. La demanda de maíz viene aumentando en los últimos años más que nada por parte de países como China y Estados Unidos (Methol, 2009). Una de las causas de esta demanda por parte de Estados Unidos comenzó desde el año 2006, a partir del cual se incentivó con mayor fuerza la producción de biocombustibles, en particular la de etanol a partir de maíz, consolidándose en 2007 un cronograma creciente de inclusión obligatoria de biocombustibles en la gasolina (Methol, 2009).

En Uruguay, en un informe realizado en base a datos obtenidos del MGAP/DIEA desde 1908 hasta la zafra 2009/10, se informa que el maíz ha estado siempre presente en la canasta a lo largo de todo este período (Saavedra, 2011). En 2012 la producción de maíz en Uruguay fue de 528.300 toneladas, alcanzando un rendimiento promedio de 4.264 Kg/há sembrada (DIEA, 2012). El área sembrada ese año alcanzó una cifra record para los últimos años de 123,9 miles de hectáreas, con un incremento del 18% respecto al año anterior. La demanda interna de maíz ha venido creciendo debido al importante crecimiento en la producción de carne y de leche (Methol, 2009). En Uruguay el 73% del maíz producido es para raciones balanceadas (Elhordoy, 1997).

El cultivo de maíz tiene un alto costo de inversión, entre los insumos que encarecen la producción es importante el uso de fertilizantes químicos. Según informa el anuario DIEA, en el año 2010 fue necesario producir 2,7 ton de maíz para pagar una tonelada de urea, y 3,7 ton de maíz para adquirir una tonelada de fosfato de amonio (DIEA 2011). En comparación con otros cultivos (arroz,

trigo, soja), el cultivo del maíz es bastante menos rentable, por ejemplo se necesita producir el doble de maíz que de soja para pagar 1 ton de urea (DIEA, 2011). Además, teniendo en cuenta que la producción de fertilizantes en Uruguay no es suficiente para el requerimiento de los productores, es necesario importar grandes cantidades. En el año 2010 se gastaron más de U\$S 83 millones solo en la importación de urea (DIEA, 2011). Estos motivos y la creciente demanda del grano impulsan a la búsqueda de nuevas alternativas que aporten soluciones y beneficios para la producción agrícola.

1.2 El Nitrógeno como nutriente vegetal y la fertilización nitrogenada

El nitrógeno es un macronutriente esencial para el crecimiento de las plantas, por lo que el nivel de producción y rentabilidad de un cultivo depende considerablemente de esta nutrición. En las plantas forma parte de aminoácidos, ácidos nucleicos, clorofilas, por ello es a menudo un nutriente limitante. La deficiencia de N provoca la aparición de clorosis en las plantas y reduce su productividad y vigor (Wiedenhoeft, 2009). El nitrógeno es generalmente considerado, después del agua, factor limitante del crecimiento vegetal (Franco y Döbereiner, 1994). En el suelo la mayor proporción de nitrógeno es orgánica (98% del total) y menos del 2% son formas minerales, como amonio, nitratos y nitritos (Frioni, 2006). Las raíces de las plantas absorben del suelo el nitrógeno en forma de nitrato (NO_3^-) o de amonio (NH_4^+). Además de que el contenido de nitrógeno en suelo es bajo, el nitrógeno es removido en cantidades superiores a los demás nutrientes (Frioni, 2006). A pesar de esto, las cantidades de nitrógeno presentes en el suelo podrían abastecer las necesidades de los cultivos, pero el nitrógeno se encuentra mayormente como N orgánico formando parte del humus, ésta sustancia es muy resistente al ataque microbiano, y solo una pequeña porción del N orgánico es mineralizable (1-3% por año) (Frioni, 2006).

El mayor reservorio de N se encuentra en la atmósfera en forma de N_2 , pero los vegetales no son capaces de asimilar esta forma de N. El proceso que permite la entrada de N_2 al ecosistema suelo-planta es conocido como fijación de N_2 (Giller y Cadisch, 1995; Martínez-Romero, 2006; Gupta *et al.*, 2012). Existen tres formas de fijación de N_2 : la fijación biológica del nitrógeno (FBN), consiste

en la conversión de gas nitrógeno (N_2) en amonio (NH_4^+), una propiedad exclusiva de microorganismos procariotas (Martínez-Romero, 2006); mientras que por vías no biológicas, el nitrógeno es fijado industrialmente mediante el proceso de Haber-Bosch, y de forma espontánea a través de tormentas eléctricas y reacciones del ozono con el N_2 . La fijación de nitrógeno en la biosfera se estima en unos 275 millones de toneladas anuales, de los cuales 139-170 millones corresponden a la FBN, 70 a la industrial y 30 a la fijación espontánea (Paul, 1988).

En el balance de N en los suelos, debemos considerar que se ha reportado que hay una continua pérdida desde suelos agrícolas debido a la cosecha de los cultivos, a la lixiviación y a las pérdidas gaseosas (Giller y Cadisch, 1995), como lo son la desnitrificación y la volatilización del NH_3 (De Datta y Buresh, 1989; Singh *et al.*, 1995). Estimaciones de pérdida de nutrientes del suelo en África Subsahariana (Stoorvogel *et al.*, 1993), Asia y Latinoamérica (Tandon, 1993), sugieren que hay una eliminación neta entre 20 y 70 Kg de N por ha desde tierras agrícolas cada año, y que esta pérdida parece aumentar (Giller y Cadisch, 1995). Por otro lado, menos del 50% del fertilizante aplicado es utilizado por la planta (Halvorson *et al.*, 2002). Estos problemas y la creciente demanda de los cultivos hacen que se tienda a aplicar indiscriminadamente los fertilizantes, provocando la contaminación del agua y de la atmósfera (Giller y Cadisch, 1995; Burney *et al.*, 2010). El uso de fertilizantes nitrogenados ha sido legislado en varios países y se realizan muchos esfuerzos por restringir su aplicación (Byrnes, 1990). Frente a esta situación se han buscado alternativas que permitan el desarrollo de una agricultura sustentable; la fijación biológica del nitrógeno promete satisfacer los requerimientos de nitrógeno por los vegetales con el cuidado de los recursos naturales.

1.3 Microorganismos promotores del crecimiento vegetal

En los últimos años se han descrito una gran diversidad de microorganismos que aportan múltiples beneficios al crecimiento de las plantas. Entre los mecanismos reportados como formas de promoción del crecimiento se encuentran los siguientes:

1. Fijación biológica de N₂ (FBN) (Hurek *et al.*, 2002; Iniguez *et al.*, 2005). Diversos estudios reportan la fijación biológica del nitrógeno como mecanismo de promoción del crecimiento vegetal, proceso que se detallará más adelante.
2. Producción de fitohormonas (Baca y Elmerich, 2007). Algunas bacterias producen fitohormonas que promueven el desarrollo y la proliferación de las raíces resultando en una absorción más eficiente de agua y nutrientes (Oliveira *et al.*, 2002). Entre las fitohormonas, es de destacar la producción de auxinas por un amplio y diverso grupo de microorganismos del suelo (Arshad y Frankenberger, 1998).
3. Solubilización de fosfato (Sturz *et al.*, 2000; Sessitsch *et al.*, 2002;). Varios reportes han examinado la habilidad de diferentes especies de bacterias de solubilizar fuentes de fosfato inorgánico insoluble, e.g. fosfato tricálcico, fosfato dicálcico, hidroxiapatita y fosfato de roca (Goldstein, 1986), dejando una fuente de fosfato disponible para los vegetales.
4. El biocontrol de fitopatógenos es otro mecanismo por el que las bacterias promueven el crecimiento vegetal (Weller, 1988; Compant *et al.*, 2005; Anandhakumar y Zeller, 2008). Los mecanismos de control más reconocidos son: competencia por un nicho ecológico o sustrato, producción de aleloquímicos inhibitorios, e inducción de resistencia sistémica (ISR) en plantas huéspedes a un amplio espectro de patógenos. Los aleloquímicos incluyen sideróforos, antibióticos, biocidas volátiles, enzimas líticas, y enzimas de detoxificación (Compant *et al.*, 2005). Es bien conocido el control biológico de las bacterias frente a los hongos fitopatógenos. En esta tesina se evaluará la capacidad de las bacterias de inhibir un hongo fitopatógeno que afecta comúnmente al cultivo de maíz: *Fusarium*. Varias especies de *Fusarium* están implicadas en la fitopatogenia del cultivo de maíz en extensas áreas de clima tropical y semitropical, provocando pudrición de la mazorca, raíz y tallo con graves reducciones del rendimiento del cultivo, a menudo estimado entre un 10 y un 30% (Logrieco *et al.*, 2002). Varias cepas de este hongo son capaces de producir micotoxinas las cuales pueden ser

formadas previo a la cosecha, o durante el almacenamiento de los granos (Logrieco *et al.*, 2002). Entre las especies de *Fusarium* que están implicadas en la producción de micotoxinas y la pudrición de la mazorca, se encuentra *Fusarium oxysporum* (Logrieco *et al.*, 2002), cepa que será evaluada en ensayos de biocontrol.

Las bacterias pueden beneficiar el crecimiento de las plantas mediante una combinación de varios de los mecanismos mencionados (Dobbelaere *et al.*, 2003).

Las bacterias que promueven el crecimiento vegetal son llamadas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB, por su sigla en inglés) y pueden establecer asociaciones con los vegetales en la rizósfera o como endófitas. La rizósfera es la zona del suelo que rodea las raíces donde se dan la mayoría de las interacciones planta-microorganismos (Frioni, 2006). Los endófitos son microorganismos que viven en el interior de los tejidos vegetales sin causar daños a su huésped (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006). Para establecer a un microorganismo como verdadero endófito, se requiere no solo su aislamiento a partir de tejidos desinfectados superficialmente sino también la visualización microscópica de la bacteria marcada dentro de los tejidos vegetales (Reinhold-Hurek y Hurek, 1998). En tanto los microorganismos que no han sido visualizados microscópicamente, lo cual no es siempre viable, éstos serán llamados posibles endófitos (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006).

Varios estudios confirman que las plantas hospedan diversas comunidades endófitas (Idris *et al.*, 2004; Krechel *et al.*, 2004; Berg *et al.*, 2005) y que casi todas las bacterias endófitas derivan de la rizósfera (Sessitsch *et al.*, 2002; Compant *et al.*, 2005; Hardoim *et al.*, 2008). Las bacterias endófitas son encontradas en raíces, tallos, hojas y semillas, aunque en muchas plantas la mayor concentración de endófitos se encuentra en las raíces (Santi *et al.*, 2013). Diversos estudios reportan el aislamiento e identificación de bacterias y hongos endófitos en maíz (Fisher *et al.*, 1992; McInroy y Kloepper, 1995; Rai *et al.*, 2007; Orole y Adejumo, 2011).

En general, la colonización de los tejidos vegetales por bacterias endófitas ocurre a bajas densidades de población con respecto a las bacterias

rizosféricas o patógenas (Hallmann *et al.*, 1997; Rosenblueth y Martínez-Romero, 2004). Las poblaciones rizosféricas alcanzan valores entre 10^7 y 10^9 ufc/g de suelo rizosférico, mientras que las endófitas de raíces rondan entre 10^5 y 10^7 ufc/g de peso fresco (Compant *et al.*, 2010). En un trabajo realizado en condiciones de campo, en la primera semana de la emergencia de las plantas de maíz, las poblaciones endófitas establecieron concentraciones del orden de 10^5 ufc por gramo de peso fresco en tallo (Rai *et al.*, 2007).

Probablemente, los endófitos provocan mayor efecto de promoción del crecimiento en las plantas en comparación con las bacterias que colonizan exclusivamente la rizósfera (Compant *et al.*, 2010). La complejidad de interacciones, el comportamiento y los efectos que pueden producir los endófitos dentro de las plantas son muy diversos y continúan en investigación. Las poblaciones rizosféricas así como las endófitas, están condicionadas por factores bióticos y abióticos (Fuentes Ramírez *et al.*, 1999; Hallmann *et al.*, 1997; Seghers *et al.*, 2004), pero las bacterias endófitas pueden estar más protegidas del estrés biótico y abiótico que las rizosféricas (Hallmann *et al.*, 1997).

Durante los últimos años, las PGPB han sido caracterizadas por su rica biodiversidad, y han sido extensamente aplicadas en la producción agrícola (Bashan, 1998; Bashan *et al.*, 2004; Lucy *et al.*, 2004; Compant *et al.*, 2005). Entre las PGPB que se han aplicado como inoculantes en distintas especies de gramíneas como maíz, arroz, trigo y caña de azúcar se encuentran bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfato (Mehnaz y Lazarovits, 2006).

1.4 Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN)

La FBN, proceso exclusivo de algunos procariotas, es una vía por la cual el nitrógeno atmosférico entra a los sistemas biológicos, por lo que es un paso muy importante en el ciclo del nitrógeno (Martínez-Romero, 2006). Consiste en la reducción del nitrógeno molecular en amonio, proceso catalizado por un complejo enzimático conocido como nitrogenasa (Martínez-Romero, 2006). Se han caracterizado tres clases de nitrogenasas entre las cuales la enzima que contiene molibdeno (Mo) ha sido ampliamente estudiada (Zhao y Li, 2004). Además, dichos sistemas enzimáticos catalizan la reducción de otras pequeñas

moléculas que contienen dobles y triples enlaces como el acetileno (C₂H₂) (Yang *et al.*, 2011).

Se hipotetiza que los tres pasos sucesivos de reducción se producen directamente en la nitrogenasa, sin acumulación de intermediarios libres (Madigan *et al.*, 2003). La reacción general del proceso es la siguiente:



Es un proceso que demanda grandes cantidades de energía, por lo tanto la síntesis y la actividad del complejo nitrogenasa se encuentra altamente regulada (Izquierdo y Nusslein, 2006). El complejo enzimático de la nitrogenasa consiste en dos subunidades: una proteína de hierro-molibdeno (FeMo) de un peso molecular de 250 kDa y formada por dos heterodímeros, codificada por los genes *nifD* y *nifK* (Componente I); y una proteína de hierro (Fe) de un peso molecular de 70 kDa que está formada por dos subunidades idénticas codificadas por el gen *nifH* (Componente II) (Zehr *et al.*, 2003). Los centros de hierro-azufre (Fe-S) están presentes tanto en el Componente I como en el Componente II y están coordinados entre las subunidades. Las nitrogenasas 'convencionales' contienen Mo en los centros de Fe-S uniendo a las subunidades. Las nitrogenasas alternativas reemplazan el Mo con vanadio (V) (*vnfH*), y las nitrogenasas 'alternativas secundarias' reemplazan Mo con Fe (*anfH*). Estas enzimas tienen algunas diferencias en su cinética de reacción y en su especificidad (Burgess y Lowe, 1996; Eady, 1996).

La expresión de los genes de la nitrogenasa está altamente regulada (Hoover, 2000), a nivel transcripcional y post-transcripcional (Chen *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999). Es así que altas concentraciones de NH₃, glutamina u otros aminoácidos pueden reprimir la transcripción de los genes que codifican la nitrogenasa (Frioni, 2006). La sensibilidad de la nitrogenasa al oxígeno impone limitaciones fisiológicas considerables en los microorganismos fijadores de nitrógeno por lo que se ven obligados a proteger la enzima del daño por el oxígeno (Dixon y Khan, 2004). Las bacterias poseen diversos mecanismos para proteger el complejo enzimático del oxígeno y así llevar a cabo el proceso de FBN. En el caso de algunas bacterias anaerobias fijan N₂ en ausencia de

oxígeno (ej. *Clostridium*). En otros casos se dan procesos de diferenciación celular, el más reconocido es el de *Rhizobium* que forma los bacteroides fijadores de nitrógeno dentro de los nódulos de las raíces o tallos de las plantas (Bergersen, 1974; Glazebrook *et al.*, 1993). Especies de *Bradyrhizobium* pueden fijar N₂ tanto en nódulos en plantas como *in vitro* cuando se les provee de ácido succínico y una pequeña cantidad de nitrógeno fijado (Phillips, 1974). Por otro lado, la bacteria perteneciente al género *Azoarcus* requiere prolina para fijar N₂, luego experimenta la diferenciación y forma una estructura llamada “diazosoma” (Karg y Reinhold-Hurek, 1996). En las cianobacterias se produce una diferenciación a heterocistos fijadores de N₂ que protegen a la nitrogenasa del oxígeno (Wolk, 1996).

1.5 Microorganismos fijadores de nitrógeno

Como se mencionó previamente, una de las formas en que las bacterias PGPB promueven el crecimiento vegetal es mediante la fijación biológica del nitrógeno y a las bacterias que cuentan con esta capacidad se les denominan diazótroficas. Estos microorganismos poseen una ventaja competitiva en un ambiente pobre en N y rico en C, como suele ser el suelo (Yim *et al.*, 2009). Por muchos años se creyó que la capacidad de fijar N₂ estaba limitada a unas pocas especies microbianas (Postgate, 1981) pero, en las últimas décadas, se ha demostrado que esta propiedad se encuentra en muchos organismos del dominio Bacteria y también entre los metanogénicos del dominio Archaea (Young, 1992). La existencia de microorganismos no fijadores que están filogenéticamente muy relacionados a los fijadores ha sido explicada por la pérdida de genes de fijación de nitrógeno o por transferencia lateral de estos genes entre los linajes bacterianos (Normand y Bouquet, 1989; Vermeiren *et al.*, 1999). La pérdida de los genes de fijación puede ser explicada dado el alto costo del proceso, y dado que no le confiere al microorganismo una ventaja selectiva si éste se desarrolla en un ambiente rico en N (Martínez-Romero, 2006).

Según Evans y Burris (1992), podemos clasificar a las bacterias fijadoras de nitrógeno en tres grupos: diazótroficos de vida libre, que fijan el nitrógeno para su propio uso y el nutriente queda disponible después de su muerte, por ej.

especies de *Klebsiella*, *Azotobacter* y *Rhodobacter* (Fischer, 1994); diazótroficos asociativos, que contribuyen al crecimiento de la planta huésped sin formación de estructuras diferenciadas, por ej. especies de *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Paenibacillus* (Beneduzi *et al.*, 2008; Santi *et al.*, 2013), y diazótroficos simbióticos, que establecen una interacción muy estrecha entre macro y micro-simbionte y en algunos casos se forman estructuras diferenciadas denominadas nódulos como en los géneros de rizobios: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* (Fischer, 1994).

Múltiples estudios reportan el aislamiento e identificación de una gran diversidad de bacterias diazótroficas rizosféricas y/o endófitas de maíz. En Uruguay, Montañez *et al.*, (2009) aislaron 178 posibles endófitos diazótroficos de raíces, tallos, hojas y semillas de maíz de diferentes variedades. Las bacterias fueron identificadas genótipicamente como *Rhizobium*, *Pantoea*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter*, *Brevundimonas* y *Burkholderia* (Montañez *et al.*, 2012). Otros autores han identificado diversos géneros de diazótroficos rizosféricos y endófitos de plantas de maíz: *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Pantoea*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Klebsiella* (Palus *et al.*, 1996; Chelius y Triplett, 2000a; Chelius y Triplett, 2000b; von der Weid *et al.*, 2002; Caballero-Mellado *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2005; Perin *et al.*, 2006; Mehnaz *et al.*, 2007).

Por otro lado, la gran diversidad de diazótroficos asociados a plantas de maíz quedó demostrada por los resultados obtenidos por Roesch *et al.*, (2008). Los autores clonaron y secuenciaron el gen *nifH* a partir del ADN extraído de las plantas de maíz crecidas en 6 regiones distintas de Brasil e identificaron una gran diversidad de géneros de las divisiones alfa, beta, gama y delta proteobacteria. Los géneros más abundantes en rizósfera, raíces y tallos de maíz fueron *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Ideonella*, *Klebsiella* y *Raoultella*.

1.6 Inoculantes y biofertilizantes

Según Bashan, (1998) un “inoculante bacteriano” es una formulación que contiene una o más cepas o especies de bacterias beneficiosas transportadas

en un material de soporte (carrier) de fácil aplicación y económico, orgánico o inorgánico o sintetizado a partir de moléculas definidas. Los efectos esperados de la inoculación en las plantas son los de promoción del crecimiento vegetal, aumento de la disponibilidad y absorción de nutrientes, y de mantenimiento de la salud de las plantas (Vessey, 2003; Adesemoye *et al.*, 2008). Por otro lado, el término “biofertilizante” es un término engañoso ampliamente usado con el significado de “inoculante bacteriano” dado que ambos consisten en preparaciones de uno o más microorganismos. A diferencia de un inoculante bacteriano el biofertilizante sólo aporta nutrientes como fósforo y nitrógeno y pueden sustituir parcial o completamente la fertilización química, pero no cuenta con los demás efectos de promoción del crecimiento vegetal producidos por las bacterias (Bashan, 1998).

Los primeros reportes del uso de inoculantes con rizobios para leguminosas datan de 1886 (Voelcker, 1896; Fred *et al.*, 1932). El método consistía en crecer la bacteria en medio con agar, suspender las células en agua, y esta suspensión era luego usada para impregnar tanto el suelo directamente o las semillas. El rol de los fijadores de nitrógeno en gramíneas comenzó a ser elucidado recién en 1970, con el descubrimiento del medio semisólido libre de N por el grupo de la Dra. Johanna Döbereiner (Döbereiner *et al.*, 1972).

La respuesta inmediata a la inoculación del suelo con PGPB asociativos no simbióticos varía considerablemente dependiendo de la bacteria, especie de planta, tipo de suelo, densidad del inóculo, y condiciones ambientales (Bashan, 1998). El obstáculo clave es que el suelo es un ambiente heterogéneo e impredecible incluso a pequeña escala (van Elsas y van Overbeek, 1993). Las bacterias inoculadas muchas veces no encuentran un nicho vacío para sobrevivir en el suelo excepto en suelo estéril, una condición que no existe en gran escala en la agricultura. Ellas deben competir con la microflora nativa que está a menudo mejor adaptada y es más resistente a la predación por protozoarios. Las formulaciones comerciales de inoculantes deben ser diseñadas para proveer una fuente segura de bacterias beneficiosas capaces de sobrevivir en el suelo y que se vuelvan disponibles para las plantas (Bashan, 1998). Existen varias formas de preparar los inoculantes y se han

reportado diversos métodos de inoculación (Kennedy *et al.*, 2004; Hungría *et al.*, 2005). El éxito en la aplicación de inoculantes requiere una infraestructura significativa para la producción y la aplicación con controles de calidad, tal como se describen en los trabajos de Kennedy *et al.*, (2004) y Hungría *et al.*, (2005).

Se han llevado a cabo diversos experimentos de inoculación en plantas de maíz en distintas condiciones obteniéndose resultados muy variables. En nuestro país, Montañez *et al.*, (2012), realizaron experimentos de inoculación de plantas de maíz en condiciones controladas. Solo una de las 15 cepas en estudio, identificada como *Pseudomonas fluorescens*, incrementó significativamente el largo de la radícula comparado a los controles sin inocular. Por otro lado, la inoculación con 10 cepas provocó un aumento de la biomasa aérea de plantas de maíz crecidas en condiciones gnotobióticas (de esterilidad). La cepa EMA83 identificada como *Rhanelia* sp. demostró promover el crecimiento de plantas de maíz en ensayos en campo (Montañez y Sicardi, 2013). En Argentina, la cepa SR1 de *Pseudomonas aurantiaca* fue formulada como inoculante de acuerdo a la evaluación de sus efectos de promoción del crecimiento en los cultivos de trigo y maíz en condiciones de campo (Rosas *et al.*, 2009). La cepa demostró efectos significativos en la promoción del crecimiento. Además, ambos cultivos presentaron alta producción con dosis de fertilización más bajas que las aplicadas convencionalmente. Por otro lado, Hungría *et al.*, (2010), identificaron las primeras cepas de *Azospirillum* que resultaron autorizadas para la producción de inoculantes comerciales en Brasil. Los trabajos siguieron protocolos de la legislación Brasileña, por ejemplo los experimentos de campo fueron realizados al menos en dos localidades diferentes representantes de las regiones donde se planta el cultivo, y al menos en dos estaciones. Hicieron en total 13 experimentos de inoculación en maíz a nivel de campo en donde se evaluó el efecto de la inoculación en: peso seco de la parte aérea, concentraciones de nutrientes, contenido de nitrógeno total, así como: contenido de N total y concentración de macro y micro nutrientes en granos. Cuatro cepas del género *Azospirillum* aumentaron la producción entre un 24 y un 30% en relación a las plantas no inoculadas, por lo que fueron

recomendadas y autorizadas para la inoculación del cultivo del maíz (Hungria *et al.*, 2010).

Uno de los factores que más afecta a la inoculación parece ser el genotipo de las plantas. Se ha postulado que las asociaciones planta-microorganismo involucran a menudo interacciones específicas (Ladha *et al.*, 1986; Benziri *et al.*, 1997). Varios autores han reportado la variabilidad de sus resultados entre plantas genótipicamente diferentes (García de Salomone y Döbereiner, 1996; García de Salomone *et al.*, 1996; Menhaz y Lazarovits, 2006; Govindarajan *et al.*, 2008; Montañez *et al.*, 2012).

En los estudios de García de Salomone y Döbereiner, (1996) y García de Salomone *et al.*, (1996) se determinaron los efectos producidos por la inoculación con cepas de *Azospirillum* spp. en experimentos realizados en campo con distintos genotipos de maíz. Se encontraron tanto efectos significativamente beneficiosos como significativamente desfavorables. Los autores encontraron diferencias entre los tratamientos en el número de bacterias, en la acumulación de N, y en el rendimiento en granos del cultivo, indicando la importancia de considerar las diferentes interacciones producidas entre bacterias y plantas con diferentes genotipos.

Por su parte, Mehnaz y Lazarovits (2006), evaluaron la inoculación con cepas seleccionadas en 4 variedades de maíz, en condiciones de invernáculo durante 30 días. Las cepas identificadas como *Gluconacetobacter azotocaptans*, *Pseudomonas putida*, y *Azospirillum lipoferum* potenciaron significativamente el crecimiento de las plantas. Sin embargo, también observaron que los efectos de la inoculación en el peso seco radicular y aéreo de las plantas, varían según el genotipo de las plantas.

En la revisión presentada por Santi *et al.*, (2013), se citan varios trabajos de inoculación con PGPB en maíz y otros cereales, mostrando el efecto de la inoculación en el % de peso seco total de las plantas. Las investigaciones y estudios sobre inoculantes en gramíneas han avanzado mucho en los últimos años, aportando resultados interesantes para el desarrollo agrícola (Bhattacharjee *et al.*, 2008; Gupta *et al.*, 2012; Yasin *et al.*, 2012).

1.7 Métodos para evidenciar los efectos de la inoculación en plantas

Una forma de evaluar la eficiencia de la inoculación es medir parámetros relacionados al crecimiento vegetal como son el peso seco de la parte aérea, peso seco radicular, la altura de las plantas o la longitud de las raíces (Carrillo *et al.*, 2002; Mehnaz y Lazarovits, 2006; Govindarajan *et al.*, 2008; Rojas-Tapias *et al.*, 2012).

Al inocular con bacterias fijadoras de nitrógeno, es común medir el efecto que produce la inoculación en la acumulación de N en los tejidos vegetales, o medir el % de N derivado de la FBN. Existen 3 metodologías en las cuales se basan varios métodos para determinar N total en las plantas: la técnica de Dumas basada en una técnica de combustión seca (Fiedler, 1984), el método de Kjeldahl que consiste en una oxidación o combustión húmeda (Bergersen, 1980), y por último una técnica basada en la espectroscopia del infrarrojo cercano (Osborne *et al.*, 1993). Las modalidades analíticas basadas en el método de Kjeldahl son las más difundidas y factibles de aplicar en los laboratorios, ya que requieren equipos comunes y sencillos (Tate, 1994). El método consiste básicamente en la reducción del N mineral y orgánico a NH_4^+ en caliente, en presencia de un catalizador concentrado de ácido sulfúrico. El NH_4^+ es recuperado por destilación o difusión y estimado por titulación o colorimétricamente (Bergersen, 1980). En el trabajo de García de Salomone y Döbereiner (1996), se determinó el porcentaje de N en plantas de maíz, utilizando el método de Kjeldahl de acuerdo a Bremner y Mulvaney (1982). En este trabajo la acumulación total de N (Kg/há) es comparada entre plantas inoculadas y plantas sin inocular, y de este modo los incrementos en la acumulación de N en las plantas pueden ser atribuidos a la FBN por los diazotrofos. Hoy en día muchos estudios se basan en estos métodos y los aplican con diversas modificaciones y/o acoplados a otras metodologías con el fin de determinar la cantidad o porcentaje del N total en la planta es derivado de la FBN.

Entre los métodos comúnmente aplicados para medir la FBN se encuentran el método de dilución isotópica de N^{15} y el ensayo de reducción del acetileno (ARA). En el ensayo de dilución isotópica de N^{15} , las plantas son crecidas en

suelos enriquecidos con N^{15} mediante fertilización con urea, amonio o nitrato. Dado que las bacterias que fijan nitrógeno, disminuyen o diluyen el N^{15} tomado del suelo, aquellas plantas que tienen una entrada importante de N por FBN, tendrán una menor concentración de N^{15} en sus tejidos comparado a las plantas controles 'no fijadoras' (James, 2000). Oliveira *et al.*, (2002) han empleado este método para medir el efecto de la inoculación con endófitos diazótroficos en el aporte por FBN a las plantas.

La técnica de reducción de acetileno se basa en que la enzima nitrogenasa es capaz de reducir otros sustratos con triple enlace además del N_2 tal como el acetileno (C_2H_2) para producir etileno (C_2H_4), que puede ser medido en un cromatógrafo de gases (Hardy *et al.*, 1968). La técnica ha sido empleada para determinar rápidamente la actividad nitrogenasa (Hardy *et al.*, 1973), y se ha aplicado no solo sobre cultivos puros y extractos celulares, sino también en raíces, suelos y ensayos en invernáculo (Bergersen, 1980; Staal *et al.*, 2001). Además de aplicarse en el laboratorio se ha aplicado también en condiciones de campo (Huss-Danell *et al.*, 1989; Rumbaugh y Johnson, 1991). Entre las desventajas del método se han detallado varias en la bibliografía (Watanabe y Cholitkul, 1979; Eskew, 1987; Witty y Minchin, 1988; Peoples *et al.*, 1989; Ladha y Tirol-Padre, 1990; Melchor-Marroquin *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2012). Principalmente es una técnica indirecta de la capacidad de fijar nitrógeno y solo en un momento dado, y no sirve para el análisis cuantitativo de la fijación del N_2 . Esta técnica es empleada frecuentemente dado que es rápida, de bajo costo y fácil de realizar (Vessey, 1994). Además, ha sido empleada para comparar los efectos de la inoculación con distintas cepas (El-Akhal *et al.*, 2012; Fernandez-Pascual *et al.*, 1988).

La introducción de una o más cepas en un medio puede provocar cambios en la abundancia y riqueza de géneros, especies o cepas, cambiando la estructura de las comunidades microbianas nativas. Los métodos clásicos que se aplican para identificar y cuantificar las bacterias asociadas a las plantas son los métodos dependientes del cultivo como los de aislamiento y recuento de viables. Existen dos técnicas muy utilizadas para enumerar a las bacterias: número más probable (NMP) y recuento en placas con medio sólido, mediante la siembra por extensión o incorporada (Chen *et al.*, 2003). Estos métodos se

pueden realizar en distintos momentos del crecimiento vegetal para seguir la colonización bacteriana de los tejidos internos así como también se pueden aplicar bajo distintas condiciones para un estudio más profundo de los factores que afectan o benefician la práctica de inoculación. Para realizar los recuentos se realizan diluciones de muestras de suelo o de tejidos vegetales como raíces, tallos u hojas desinfectados superficialmente. Posteriormente se siembran ya sea en placa o en tubos, empleando medios de cultivo que pueden ser selectivos o diferenciales con un sustrato determinado (por ejemplo para revelar bacterias previamente marcadas con genes cromogénicos). El recuento por NMP es un método estadístico que requiere el uso de tablas de probabilidad para procesar los datos (MacCrady, 1915), y aporta el número más probable de microorganismos de una amplia variedad de muestras. El método de recuento por NMP empleado por García de Salomone y Döbereiner (1996) les permitió detectar y estimar el número de bacterias de *Azospirillum* spp. establecidas en plantas de maíz inoculadas en condiciones de campo.

En los últimos años para el estudio de las comunidades microbianas se han aplicado extensamente las técnicas independientes del cultivo basadas en la amplificación por PCR. La técnica DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) o la variante TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*) (Muyzer *et al.*, 1993), es una técnica de *fingerprinting* que provee información sobre la variación en base a la composición (%G + C) de genes del rARN o genes funcionales. El método de T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Liu *et al.*, 1997; Sessitsch *et al.*, 2001) es otro de los métodos de *fingerprinting* frecuentemente usado. Debido a su simplicidad, la técnica de T-RFLP ha sido aplicada para el análisis de genes de hongos, bacterias, arqueas y de genes funcionales (Schütte *et al.*, 2008). En esta técnica una vez extraído y purificado el ADN, es cuantificado y las concentraciones son estandarizadas entre las muestras previo a la PCR. Los genes seleccionados son luego amplificados de la muestra de ADN por PCR. Las reacciones de PCR son preparadas usando *primers* donde cualquiera de los *primers forward* o reverse son marcados con un fluoróforo. Cuando las secuencias de ADN altamente conservadas son amplificadas, los productos de PCR resultantes serán de tamaño similar. Para separarlos y obtener un

fingerprint, los productos de PCR son digeridos por una o varias enzimas de restricción en reacciones separadas. Los ADN amplificados de diferentes organismos que contienen diferentes sitios de restricción van a producir fragmentos terminales marcados de distintos tamaños. El largo de los fragmentos terminales marcados son luego medidos en un secuenciador automatizado, de este modo se produce un *fingerprint* característico de la comunidad (Thies, 2007). Los *fingerprints* se pueden comparar entre las muestras para detectar diferencias en las estructuras de las comunidades, cambios de las mismas a través del tiempo, o cambios bajo condiciones bióticas o abióticas diferentes.

Los métodos de T-RFLP y DGGE se han empleado extensamente para el estudio y análisis de poblaciones de diazótrofes de diferentes hábitats (Zhang *et al.*, 2007). También han sido usadas para detectar cambios en las comunidades luego de la inoculación (Herschkovitz *et al.*, 2005; Buddrus-Schiemann *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011).

Todos los métodos basados en PCR tienen limitaciones principalmente causadas por las extracciones de ADN de las muestras (Head *et al.*, 1998; Gelsomino *et al.*, 1999; Niemi *et al.*, 2001). La eficiencia de los métodos de extracción son variables de acuerdo a la remoción de las sustancias inhibitorias, al mantenimiento de la integridad del ADN y a la amplificación parcial durante la PCR (Wagner *et al.*, 1994; Mathieu-Daude *et al.*, 1996; von Wintzingerode *et al.*, 1997).

La técnica de PCR en tiempo real (qPCR) es otra de las técnicas basadas en la PCR, y es ampliamente aplicada en ecología microbiana para cuantificar la abundancia y la expresión de genes marcadores taxonómicos y funcionales en las muestras ambientales (Smith y Osborn, 2009). Este método ha sido empleado para el análisis del número de bacterias en las plantas luego de la inoculación (Couillerot *et al.*, 2010; Quecine *et al.*, 2012).

El estudio de los efectos provocados por la inoculación con diazótrofes y PGPB en los cultivos es importante para el desarrollo de inoculantes y esquemas de inoculación. Al mismo tiempo, es necesario tener en cuenta los diferentes

factores que afectan los resultados. La respuesta de las plantas a la inoculación debe ser efectiva y poco variable. El presente trabajo surgió a partir de los antecedentes de Montañez *et al.*, (2009) quienes determinaron que el porcentaje de N derivado de la atmósfera varía entre distintas variedades de maíz. En base a esos resultados se seleccionaron las variedades de maíz PAU871 y NK940 de las que se aislaron y caracterizaron bacterias diazótrofes de suelo rizosférico, raíces y tallos (Rodríguez-Blanco, 2011). El objetivo de esta tesina fue determinar posibles PGPB con potencial para el cultivo de maíz.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de la inoculación con bacterias diazótrofes seleccionadas en dos variedades de plantas de maíz (*Zea mays* L.) PAU871 y NK940 bajo la influencia de distintos factores.

Objetivos específicos

- Evaluar la actividad celulolítica y pectinolítica, y la capacidad de inhibición del crecimiento del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum in vitro* de 8 cepas de bacterias diazótrofes aisladas de maíz.
- Evaluar el efecto de la inoculación con bacterias diazótrofes en la germinación de las semillas y en el crecimiento temprano de plantas de maíz de distintas variedades crecidas en condiciones gnotobióticas.
- Evaluar el efecto de la concentración del inóculo y de la fertilización nitrogenada en el crecimiento de plantas de maíz de la variedad PAU871 en condiciones controladas.
- Estudiar la capacidad de las cepas seleccionadas de promover el crecimiento de plantas de maíz de las variedades PAU871 y NK940 crecidas en macetas con suelo bajo condiciones controladas.
- Determinar los cambios provocados por la inoculación en el número y estructura de la comunidad de diazótrofes rizosféricos y endófitos de plantas de maíz.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Bacterias diazotrofas

Se utilizaron 8 cepas bacterianas aisladas de rizósfera, raíces y tallos de plantas de maíz de las variedades PAU871 y NK940. Las cepas fueron caracterizadas en trabajos previos por sus características promotoras del crecimiento vegetal (Tabla 1).

Tabla 1. Características de las bacterias diazotrofas aisladas de plantas de maíz de las variedades NK940 y PAU871.

Especie/cepa	Origen	<i>nifH</i> ^a	AIA ^b ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	IS fosfatos ^c
<i>Raoultella terrigena</i> 10R	Raíz NK940	+	93	>2
<i>Raoultella terrigena</i> 32R	Raíz PAU871	+	88	1-2
<i>Raoultella terrigena</i> 50T	Tallo NK940	+	76	1-2
<i>Ochrobactrum</i> sp. 55T	Tallo PAU871	+	130	>2
<i>Enterobacter</i> sp. 59T	Tallo PAU871	+	134	1
<i>Pseudomonas</i> sp. 70T	Tallo NK940	+	92	1-2
<i>Pseudomonas</i> sp. 79S	Rizósfera NK940	+	67	1-2
<i>Enterobacter</i> sp. 87S	Rizósfera PAU871	+	87	>2

^aamplificación de un fragmento del gen *nifH* utilizando PCR anidada (Yeager *et al.*, 2004).

^bproducción de ácido indol acético (AIA) en medio TY con 2 mg.mL⁻¹ de triptófano, determinado mediante el método de Salkowsky (Loper y Schroth, 1986); ^cÍndice de solubilización (IS) en medio NB-RIP con fosfato tricálcico como única fuente de fósforo (Kumar y Narula, 1999).

3.2 Actividad celulasa y pectinasa

La capacidad de degradar celulosa y pectina de las cepas fue estudiada por formación de halos de degradación de estos compuestos en medios de cultivo sólido.

La capacidad de hidrolizar celulosa fue evaluada en placas con medio de cultivo JNFb (Anexo) modificado, con 0,25% de carboximetilcelulosa (CMC), 0,5% de triptona y 12g de agar/Lt. En cada placa se sembró una gota de 10 µl de los cultivos puros de cada una de las 8 cepas crecidas en medio TY (Anexo) líquido (10^9 bacterias/ml), y se hicieron 3 replicados de cada placa. Luego de que las placas fueron incubadas 48hs a 30°C, se les agregó una solución de Rojo Congo 1mg/ml por 30 min. Posteriormente, se lavó con NaCl 1M y se midió el halo de degradación.

Para determinar la capacidad de degradación de pectina se utilizó medio LB (Anexo) con 0,5% de pectina. Las cepas fueron sembradas de la misma forma que para la degradación de celulosa. Las placas fueron incubadas durante 5 días a 30°C. El revelado de los halos se hizo agregando una solución de Lugol durante 1 min, seguido de varios lavados con NaCl 1M.

La actividad hidrolítica de cada sustrato se expresó como la resta entre el halo de degradación menos el diámetro de la colonia formada en centímetros.

3.3 Capacidad de inhibición del crecimiento de Fusarium oxysporum in vitro

Las 8 cepas seleccionadas fueron evaluadas por su capacidad de inhibir el crecimiento del hongo patógeno *Fusarium oxysporum in vitro*. Para este ensayo se sembraron cultivos duales en placas de PDA (Anexo), se colocó un triángulo de agar conteniendo micelio del hongo en el centro de la palca y una estría de la bacteria a cada lado del triángulo (a 2 cm de distancia). Las placas se incubaron en oscuridad a 25°C durante 10 días. Se realizaron 3 repeticiones por cada cepa.

La capacidad de inhibición del crecimiento del hongo por las distintas cepas analizadas fue medida como la resta del diámetro de la colonia del hongo

crecido en placas controles (sin bacterias sembradas) menos el diámetro de la colonia del hongo sembrado en cultivos duales. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición (Idris *et al.*, 2007).

3.4 Efecto de un curasemillas en el crecimiento de las cepas

Previo a los ensayos de inoculación se determinó si el producto químico con el que estaban curadas las semillas actuaba sobre los cultivos bacterianos. El ensayo se realizó con las semillas de maíz de la variedad PAU871 y no con las de la variedad NK940 debido a que estaban curadas con el mismo curasemillas. Las cepas fueron crecidas en medio TY líquido a 28°C durante 24 hs. Se ajustó la densidad óptica de cada cultivo a 0,8 unidades de absorbancia (10^9 cel/mL). Las semillas de maíz de la variedad PAU871 que estaban curadas con un producto comercial fueron lavadas colocando 100 semillas en 500 mL de agua destilada estéril. Se realizaron diluciones seriadas de los cultivos líquidos de cada cepa utilizando el agua del lavado de las semillas (con curasemillas) y controles (cultivos bacterianos diluidos en agua estéril sin fungicida). Se sembraron 100 μ l de la dilución 10^{-5} de los cultivos de cada cepa diluida con y sin curasemillas se sembraron en placas con medio TY, por triplicado. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 24 hs. Se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (ufc) en las placas que presentaron entre 30 y 300 colonias.

3.5 Efecto de la inoculación sobre la elongación de la radícula

Se evaluó el efecto de la inoculación con las cepas seleccionadas en el crecimiento de la raíz principal de las semillas de maíz de la variedad PAU871 y NK940. Las semillas fueron desinfectadas superficialmente con 3 lavados con agua destilada, un lavado con alcohol al 70% durante 3', seguido de un lavado con hipoclorito 5% durante 5', y posteriores enjuagues con agua destilada estéril. Las semillas desinfectadas fueron impregnadas en 50 mL de cultivo de TY líquido de cada cepa conteniendo 10^9 cel/mL durante 2 hs (inoculación en semilla). Por cada variedad y por cada una de las cepas se colocaron 10 semillas inoculadas sobre la superficie de placas con agar agua. Como controles se impregnaron semillas desinfectadas en 50 mL de medio TY líquido

estéril durante 2 hs y se colocaron sobre la superficie de una placa con agar agua. Las placas se incubaron a 28°C durante 48 h. Al cabo de ese tiempo, se midió con regla el largo de las radículas de las semillas. Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias empleando el test de Fisher $p < 0.05$ (Infostat, 2008).

3.6 Efecto de la inoculación en plantas de maíz crecidas en condiciones gnotobióticas

Para este ensayo se utilizaron semillas de las variedades PAU871 y NK940, que fueron lavadas y desinfectadas superficialmente y luego germinadas en placas de agar agua durante 48 hs a 28°C. Cada semilla fue sembrada en tubos con 25 mL de medio Farheüs sin nitrógeno combinado (Anexo). A los 3 días de sembradas, las plántulas fueron inoculadas con 1 mL de cultivo de cada cepa crecida en medio TY (concentración de 10^9 cel/mL) (método de inoculación en plántula). Se inocularon 3 plántulas por cada una de las 8 cepas. Se incluyeron 3 plantas controles de cada variedad (sin inocular). Las plantas fueron mantenidas en cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 h luz /8 h oscuridad, con una intensidad de luz de 800 μ moles de fotones $m^{-2}.seg^{-1}$, y 24°C día/22°C noche. Al cabo de 15 días de la inoculación las plantas fueron cosechadas y se obtuvieron los valores de peso seco de raíz y de parte aérea. Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias empleando el test de Fisher ($p < 0.05$). Se determinó el coeficiente de correlación de Pearson entre el peso seco de la parte aérea y el peso de la raíz para ambas variedades (Infostat, 2008).

3.7 Efecto de la inoculación con distintas concentraciones de inóculo en plantas de maíz creciendo, con y sin fertilización nitrogenada

Para realizar este ensayo se seleccionaron las cepas 10R y 59T. Las semillas de la variedad PAU871, previamente lavadas y desinfectadas, fueron germinadas en placas de agar agua durante 48 hs a 28°C. Las semillas germinadas fueron sembradas en macetas con 1 kg de arena:vermiculita estéril (relación 2:1) y fueron regadas periódicamente con solución nutritiva (Farheüs estéril). Las plántulas fueron inoculadas con 1 ml de distintas concentraciones

de las cepas: 10^5 , 10^7 y 10^9 células/mL. Tres repeticiones de cada tratamiento fueron crecidas sin el agregado de nitrógeno y tres fueron crecidas con el agregado de una dosis de N50 (equivalente a 50 Kg/há) agregado como NH_4NO_3 en la solución nutritiva en el momento de la siembra. Se incluyeron plantas controles (sin inocular) crecidas sin nitrógeno y con el agregado de una dosis de N50 y de N100 (100 Kg/há) también agregado como NH_4NO_3 en el momento de la siembra. Las plantas fueron mantenidas en cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 h luz /8 h oscuridad, con una intensidad de luz de 800 μmoles de fotones $\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$, y 24°C día/22°C noche. A los 15 días de la inoculación se determinó peso seco de la parte aérea y radicular de cada planta. Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias empleando el test de Fisher ($p < 0.05$) (Infostat, 2008).

3.8 Efecto de la inoculación en plantas de maíz crecidas en macetas con suelo

El ensayo se realizó con semillas de maíz de las variedades PAU871 y NK940 lavadas y desinfectadas superficialmente. Se escogieron 5 cepas para la inoculación: 10R, 32R, 55T, 59T y 79S y un consorcio con las 5 cepas (Mezcla). Las cepas fueron crecidas en frascos con 50 mL de medio TY líquido durante 24 hs a 28°C con agitación. El consorcio se realizó mezclando 1 mL de cada cultivo crecido. Para la inoculación las semillas de cada variedad desinfectadas superficialmente se impregnaron durante 7 hs en los cultivos líquidos de cada cepa (10^9 células/mL). Las semillas inoculadas se sembraron en macetas con una mezcla de suelo:arena estéril con una relación 1:2. Se sembraron 3 repeticiones de cada tratamiento y se incluyó un tratamiento control (semillas sin inocular). A los 15 días de la germinación se realizó una 2ª inoculación agregando en la base del tallo de cada planta 5 mL de cultivo crecido durante 24 hs en medio TY (10^9 células/mL).

Las plantas fueron regadas con agua destilada y mantenidas en cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 h luz /8 h oscuridad, con una intensidad de luz de 800 μmoles de fotones $\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$, y 24°C día/22°C noche. Las plantas de la variedad PAU871 fueron cosechadas a los 32 días de sembrada y las de la variedad NK940 a los 35 días. Se determinó el peso seco de la parte

aérea de cada planta. Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias empleando el test de Fisher $p < 0.05$ (Infostat, 2008).

Se tomaron muestras de suelo rizosférico y de raíces para los recuentos de diazótrofes rizosféricos y endófitos mediante el método del número más probable (NMP) y para realizar posteriormente la extracción de ADN y el T-RFLP.

Una vez separada la raíz de la parte aérea, se sacudió la raíz y se recogió el suelo más próximo a las raíces para formar así muestras del suelo rizosférico de cada planta. Las raíces fueron lavadas con agua destilada y desinfectadas superficialmente mediante un lavado con alcohol 70% durante 3 min, hipoclorito 2,5% durante 5 min, y 3 lavados con agua destilada estéril.

3.9 Recuento de fijadores de nitrógeno por número más probable

A partir de 1 g de suelo rizosférico de cada planta crecida en maceta con suelo (método anterior) se hicieron diluciones seriadas en suero fisiológico 0,85% hasta la dilución -6. Se sembraron por triplicado 100 μ L de las diluciones -4 -5 y -6 en frascos con 5 mL de medio JNFb semisólido (Anexo). Los frascos se incubaron durante 7 días a 28°C.

Se pesó 1 g de raíces desinfectadas, se cortaron en trocitos y se maceraron en mortero estéril con 9 mL de suero fisiológico 0,85% (dilución -1). A partir de este macerado se realizaron diluciones seriadas hasta -5. Las diluciones -3, -4 y -5 fueron sembradas por triplicado en frascos con medio JNFb semisólido. Los frascos se incubaron durante 7 días a 28°C.

Se consideraron positivos los frascos que presentaron viraje de indicador y crecimiento (película o turbidez). Se calculó el número más probable (NMP) de diazótrofes por gramo de muestra empleando las tablas de Mac Grady (Döbereiner *et al.*, 1995).

El NMP de diazótrofes por gramo de material fresco (raíz, o suelo rizosférico) fue transformado a log NMP. Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias empleando el test de Fisher $p < 0.05$ (Infostat, 2008).

3.10 Estructura de la comunidad de diazotrofos en plantas de la variedad PAU871 mediante la técnica de T-RFLP

A partir del ensayo de inoculación de plantas de maíz crecidas en macetas, se tomaron muestras para comparar la estructura de la comunidad de diazotrofos de plantas inoculadas y sin inocular mediante la técnica de T-RFLP usando como marcador el gen *nifH*. Las muestras utilizadas procedieron de rizósfera y raíces de plantas de la variedad PAU871 inoculadas con las cepas 10R, 55T, 59T, 79S. Se incluyeron plantas sin inocular (controles) y se realizó el análisis por triplicado.

Las muestras de suelo rizosférico fueron almacenadas directamente en el freezer hasta su procesamiento mientras que las raíces fueron maceradas en N líquido inmediatamente luego de la cosecha y almacenadas en freezer.

Para la extracción de ADN se emplearon 300 mg de suelo rizosférico y el kit comercial Power Soil DNA (MoBio, USA), mientras que para la extracción de ADN de raíces se emplearon 500 mg y el kit comercial UltraClean DNA (MoBio, USA). El ADN extraído fue visualizado en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio bajo luz UV, para verificar la calidad del mismo y cuantificarlo por la intensidad de la banda. Se realizó una PCR anidada del gen *nifH* con dos juegos de *primers* degenerados (Yeager *et al.*, 2004). La mezcla de reacción de la primera PCR contenía una concentración final de 1x de Thermo buffer, 0,2 mM de dNTP, 2 mM de MgCl₂, 2 µM de los *primers* *nifH*19 y *nifH*3, 1 mg/mL de BSA, 1 U de la enzima Taq polimerasa (Fermentas, Canadá) y agua MQ. El volumen de mix por cada tubo de PCR fue de 13 µl, agregando 2 µl de ADN. Se incluyeron como controles positivos lisados de cultivos puros de la cepa 10R (para hacer los lisados se tocó con la punta de un tip estéril una colonia aislada que se resuspendió en 25 µL de buffer de lisis con 0.05 % NaOH y 0.25 % SDS y se incubó a 95°C por 10 min. Se agregaron 225 µL de agua mili Q estéril y se centrifugó por 5 min a 12000 rpm. El sobrenadante se conservó a -20°C.) y como controles negativos se realizó la mezcla de los reactivos sin

ADN molde. El ciclado consistió en un primer paso de desnaturalización a 95°C durante 5 min, seguido de 20 ciclos de (94°C 45 minutos, 48°C 1 minuto y 72°C 1 minuto), finalizando a 72°C por 10 minutos. El producto de PCR se visualizó en un gel de agarosa 1%. Para la segunda reacción de PCR se utilizaron los *primers nifH11* y *nifH22*, el primero de ellos marcado con el fluoróforo FAM en el extremo 5'. La mezcla de reacción contenía 1x de Thermo buffer, 2mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,8 µM de cada primer, 1 mg/mL de BSA, 1,5 U de la enzima Taq polimerasa (Fermentas, Canadá) y agua MQ en cantidad necesaria. El volumen de la reacción fue de 25 µl, 23 µl de mix y 2 µl de una dilución 1/10 del producto de la 1ª PCR. El programa de PCR consistió en un primer paso de desnaturalización a 95°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de (94° 45 minutos, 54° 1 minuto y 72° 1 minuto), finalizando a 72° por 10 minutos. Los productos de amplificación, fragmentos de aproximadamente 360 pb, fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las condiciones de la electroforesis y visualización fueron las mismas anteriormente descritas.

De cada muestra se realizaron 3 reacciones de PCR independientes que fueron mezcladas antes de la purificación que se realizó utilizando el kit comercial Ron's PCR-Pure Kit (Bioron, Alemania). La cuantificación del ADN purificado se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, utilizando el marcador de peso molecular GeneRuler 100 pb DNA (Fermentas, Canadá).

Cada producto de PCR fue digerido con la enzima *HhaI*. La digestión se realizó en un volumen total de 15 µL, con 100 ng de ADN (volumen entre 8-10 µL del producto de PCR purificado), buffer 1X (Fermentas, Canadá), 3 U de enzima (Fermentas, Canadá) y agua hasta completar el volumen. La reacción se llevó a cabo durante 5 h a 37°C en baño seco, en condiciones de oscuridad y se detuvo la reacción mediante incubación a 65°C durante 30 min.

Los fragmentos terminales marcados (TRFs) fueron detectados por MacroGen (Seul, Corea) utilizando un secuenciador ABI3730X (Applied Biosystem). Para

calcular el largo de los fragmentos marcados se utilizó como estándar interno GS500LIZ y el programa GeneScan™ (Applied Biosystems).

Los electroferogramas obtenidos fueron estandarizados eliminando los picos menores a 30 pb y los mayores a 360 pb. Cuando la diferencia en pb entre los picos fue mayor a 2 pb se tomaron como picos diferentes. Se calculó la abundancia relativa de cada pico (fluorescencia de cada pico/fluorescencia total de la muestra) por Excel y se eliminaron aquellos picos con abundancia menor al 1%. Se construyó una matriz con los porcentajes de abundancia relativa de cada TRF para cada muestra. Se tomaron en cuenta solo los TRFs que estaban presentes al menos en 2 de las 3 repeticiones y se realizó el promedio entre las repeticiones de cada tratamiento. En base a esta matriz se construyó una matriz de ausencia y presencia (0 y 1). Se calcularon los valores del índice de riqueza (S) y del índice de Diversidad de Shannon (H) para cada tratamiento utilizando el programa PAST (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>). Utilizando este programa también se realizó el análisis de agrupamiento (cluster) basado en similitud de Jaccard. Por otro lado, se evaluaron diferencias entre los perfiles de las comunidades de plantas inoculadas de las no inoculadas mediante gráficos Excel.

4. RESULTADOS y DISCUSIÓN

4.1 Actividad celulolítica y pectinolítica

Las ocho cepas en estudio evidenciaron capacidades diferentes en la degradación de componentes de las paredes vegetales. En la Tabla 2 se muestran los valores de los halos de hidrólisis producidos por las cepas estudiadas en medio sólido con 0,50% de pectina y con 0.25% de CMC. Se encontraron diferencias significativas entre las cepas en cuanto a la capacidad de hidrolizar pectina. Cuatro cepas no presentaron esta capacidad o presentaron una capacidad de hidrólisis muy baja. La cepa 32R presentó la mayor actividad pectinolítica con un halo de 3 cm de degradación, siendo ésta y la cepa 55T las que presentaron una capacidad significativamente superior a los demás tratamientos. Por otro lado, todas las cepas presentaron capacidad similar de hidrólisis de CMC en el medio sólido, sin mostrar diferencias significativas. Los halos de degradación de CMC presentados por las cepas seleccionadas en promedio fueron de 3 mm (Tabla 2).

Tabla 2. Hidrólisis de pectina y carboximetilcelulosa (CMC) por las cepas analizadas

	Halo de degradación de:	
	CMC (cm)*	Pectina (cm)*
<i>Raoultella terrigena</i> 10R	0,27 sd	0,00 d
<i>Raoultella terrigena</i> 32R	0,37 sd	3,00 a
<i>Raoultella terrigena</i> 50T	0,30 sd	0,00 d
<i>Ochrobactrum</i> sp. 55T	0,33 sd	2,55 b
<i>Enterobacter</i> sp. 59T	0,27 sd	0,15 d
<i>Pseudomonas</i> sp. 70T	0,18 sd	0,85 c
<i>Pseudomonas</i> sp. 79S	0,25 sd	1,00 c
<i>Enterobacter</i> sp. 87S	0,18 sd	0,20 d

* Los valores representan un promedio de 3 repeticiones. Letras diferentes en cada columna representan diferencias significativas entre las cepas (Fisher, $p < 0.05$). sd: sin diferencias significativas.

Se observó que la capacidad de degradar pectina varía entre cepas de la misma especie dado que una de las cepas de *R. terrigena* presentó la mayor capacidad de degradación, y las otras dos cepas de *R. terrigena* presentaron una capacidad pectinolítica nula. Los resultados sugieren que la cepa 32R de *R. terrigena* y la 55T de *Ochrobactrum* sp. podrían producir pectinasas con una alta actividad, que podrían contribuir en la colonización de estas bacterias a los tejidos internos de las plantas.

Las pectinasas y celulasas han sido implicadas en los mecanismos de entrada de los microorganismos a los tejidos internos de las plantas. Hallman *et al.*, (1997), han propuesto que las enzimas pectinolíticas y celulolíticas producidas por las bacterias endófitas contribuyen a los procesos de infección en las plantas. La actividad pectinolítica ha sido propuesta como responsable de la invasión por *Azospirillum* sp. a las raíces, por penetración de la laminilla media y de los puntos de emergencia de las raíces laterales (Bekri *et al.*, 1999).

Por otro lado, las enzimas como pectinasas y celulasas también son producidas por microorganismos patógenos, por lo que es necesario un mayor conocimiento de la regulación y expresión de estas enzimas (Verma *et al.*, 2001). Es de suponer que en el proceso de colonización microbiana al penetrar y dañar los tejidos de las plantas, la misma active sus genes de defensa para protegerse de los endófitos. De hecho, varios estudios demuestran que cuando las plantas son inoculadas con PGPRs aumentan su resistencia, provocando cambios fisicoquímicos (Anderson y Guerra, 1985; Van Peer *et al.*, 1991; Zdor y Anderson, 1992). La capacidad pectinolítica de las cepas 32R y 55T puede ser favorable o no, dado que si producen las enzimas en los tejidos internos de las plantas podrían provocar daños en las mismas. Por otro lado, Verma *et al.*, (2001) indican que las enzimas hidrolíticas podrían ser producidas por los endófitos sólo durante las etapas tempranas de la invasión y no mientras residen en los tejidos de las plantas.

Sería interesante determinar si esta actividad hidrolítica se expresa durante la interacción planta-bacteria o sólo se expresa *in vitro*, así como determinar si efectivamente esta capacidad está implicada en el proceso de colonización vegetal.

4.2 Capacidad de inhibir el crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum* in vitro

Las ocho cepas inhibieron el crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum* in vitro en cultivos duales a los 10 días de incubación (Figura 1). Las cepas fueron clasificadas en 3 grupos según su capacidad de inhibir a *Fusarium oxysporum*. El grupo A incluyó las cepas 50T de *R. terrigena*, 70T y 79S de *Pseudomonas* sp. que presentaron la mayor capacidad de inhibición (61 %), el grupo B las cepas 10R y 59T que presentaron una capacidad media de inhibición (46 %), y el grupo C las cepas 55T, 87S y 32R que presentaron la menor capacidad de control del crecimiento del hongo (23 %).

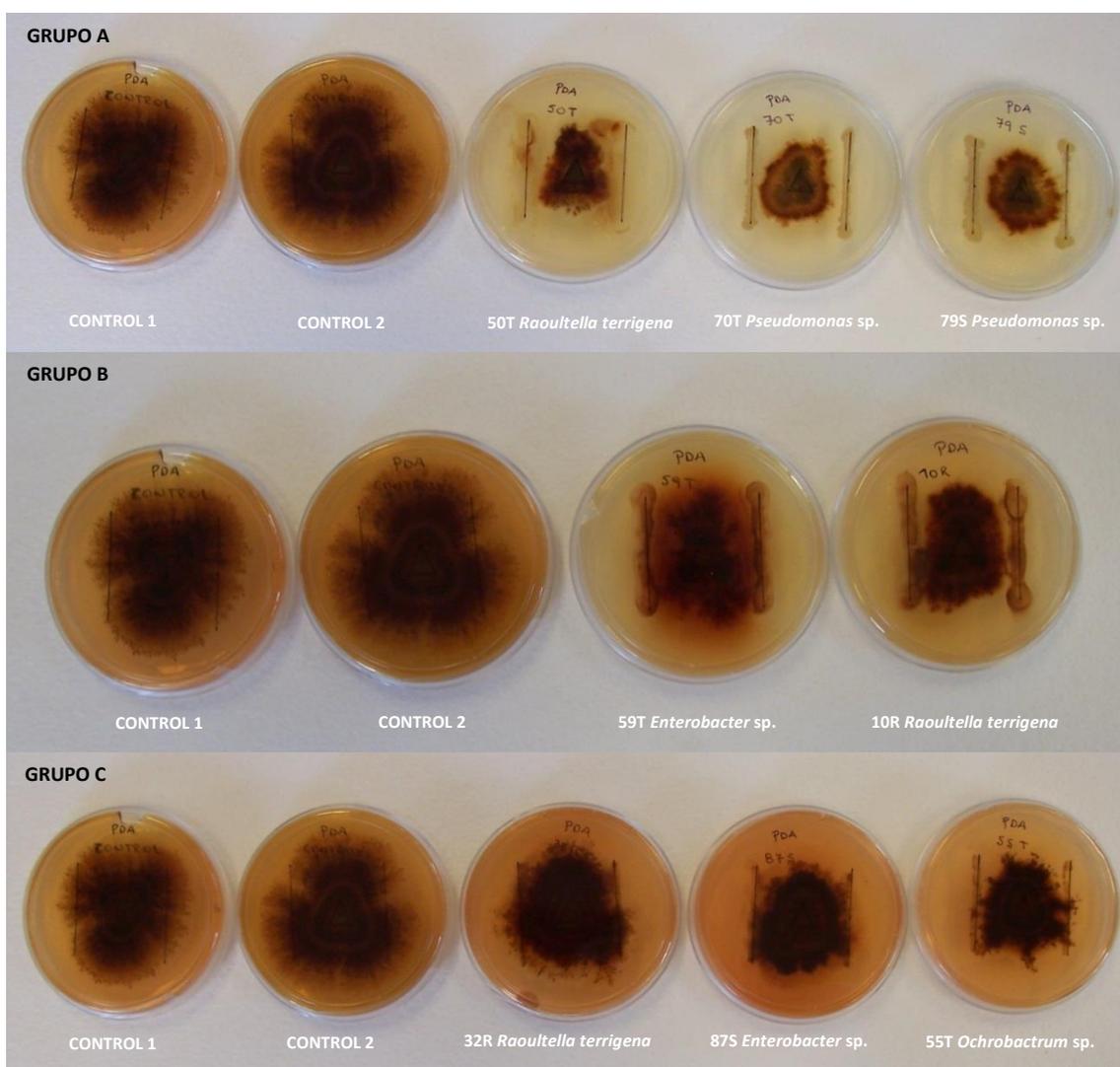


Figura 1. Interacción entre *Fusarium oxysporum* y las cepas bacterianas en cultivos duales en medio PDA. La capacidad de inhibición de las cepas fue clasificada en 3 grupos A, B y C. Las del grupo A produjeron 61% de inhibición, las del grupo B 46% de inhibición, y las del grupo C 23% de inhibición en el crecimiento de la colonia del hongo.

Como se ha mencionado previamente, el biocontrol de fitopatógenos puede ser otro mecanismo por el cual las bacterias promuevan el crecimiento vegetal. Distintos mecanismos de biocontrol pueden ser llevados a cabo por las bacterias que resultan beneficiosos para las plantas. Una de las formas es la producción de aleloquímicos, como por ejemplo la producción de quitinasas extracelulares por *Paenibacillus* sp. y *Streptomyces* sp. que suprimen el crecimiento de *Fusarium oxysporum* (Compant *et al.*, 2005). A su vez, se han reportado cepas de *Pseudomonas* como biocontroladoras de dicho hongo mediante competencia por el ion Fe y mediante la degradación del ácido fusárico, toxina producida por *F. oxysporum* (Scher y Baker, 1982; Utsumi *et al.*, 1991).

Entre las cepas estudiadas en esta tesina, dos de las provocaron mayor inhibición del crecimiento del hongo fueron cepas de *Pseudomonas* sp., género que ha sido ampliamente reportado como productor de sideróforos y con un alto potencial para su uso en control biológico (Zdor y Anderson, 1992; Cornelis y Matthijs, 2002; Montañez *et al.*, 2012; Tailor y Joshi, 2012). Por otro lado, la cepa 50T (*Raoultella terrigena*), que también disminuyó considerablemente el crecimiento del hongo, no ha sido reportada como biocontroladora de este hongo. Los resultados obtenidos son preliminares para estudios de control biológico y deberían realizarse más ensayos para determinar si las cepas producen los mismos efectos en las condiciones naturales del crecimiento del hongo y para determinar cuál es el mecanismo involucrado en el control biológico.

4.3 Efecto de un curasemillas en el crecimiento de las cepas

Dado que para la realización de los ensayos de inoculación se contaba con semillas de maíz previamente curadas se evaluó el efecto de este curasemilla en la viabilidad de las bacterias en estudio. La empresa que proporcionó las semillas no aportó los datos sobre la composición del curasemilla aplicado a las variedades PAU871 y NK940.

El curado de las semillas es una práctica muy importante ya que elimina patógenos y previene algunas de las enfermedades que puedan contraer las

plantas. Comercialmente se encuentran disponibles curasemillas con poder insecticida, nematocida y fungicida entre otros. El tratamiento adecuado con los curasemillas requiere un correcto manejo y aplicación, la conservación del mismo, y la correcta elección del principio activo y de la dosis a aplicar. Distintos aspectos pueden ser o no compatibles con la aplicación de inoculantes bacterianos. Existen una gran diversidad de curasemillas con distintos principios activos, y muchos de ellos consisten en la mezcla de estos componentes para obtener mejores resultados. Se han observado varios efectos de los curasemillas en las bacterias, tanto negativos como positivos. Algunos curasemillas poseen como principio activo el imidacloprid, que provee acción insecticida y es aplicado para el cultivo del maíz (Schnier *et al.*, 2003). Se ha descrito que el componente imidacloprid suprime las comunidades bacterianas del suelo pero a una velocidad lenta y normalmente luego de 21 días de la aplicación su efecto negativo desaparece (Ahmed y Ahmad, 2006). Otro curasemilla insecticida y nematocida altamente efectivo en maíz que contiene como principio activo al carbofurán (Hamill y Penner, 1973), parece tener efectos inhibitorios en la actividad nitrogenasa en *Azospirillum* sp. cuando se aplican altas concentraciones (Kanungo *et al.*, 1998).

En cuanto al ensayo realizado en esta tesina, se observó que el producto químico con el cual estaban curadas las semillas afectó significativamente el crecimiento de 4 de las 8 cepas en estudio (Tabla 3). Los resultados obtenidos permitieron detectar que el curasemilla afecta diferencialmente el crecimiento de las cepas, mientras que para algunas cepas el contacto con una solución con el curasemilla provocó una disminución del número de bacterias viables, para otras cepas no se observó un efecto negativo. Por este motivo, en los ensayos posteriores se dispuso realizar varios lavados de las semillas antes de la desinfección superficial, con el fin de eliminar el curasemilla y no afectar la viabilidad de los cultivos usados como inoculantes.

Los resultados obtenidos demuestran que en la aplicación de inoculantes a nivel de campo se deben conocer las posibles interacciones entre los componentes del curasemilla y las bacterias, conocer los efectos que se pueden producir para evitar fallas de la inoculación.

Tabla 3. Efecto de un curasemillas en el recuento de viables de los cultivos bacterianos

Tratamiento	Log ufc/ml
10R	8,98
10R#	8,91
32R	9,62*
32R#	7,78
50T	9,37
50T#	9,23
55T	9,55
55T#	9,87*
59T	9,71*
59T#	7,93
70T	9,08
70T#	9,03
79S	9,56*
79S#	8,84

Indica que el cultivo bacteriano estuvo en contacto con una solución con curasemilla previo a la siembra en placa.

* Indica diferencias significativas entre el tratamiento con curasemilla y sin curasemilla (Fisher $p < 0.05$).

4.4 Efecto de la inoculación sobre la elongación de la radícula

Este ensayo consistió en determinar si las cepas de diazótrofes analizadas eran capaces de producir efectos promotores del crecimiento en los primeros estadios de desarrollo de las plantas. En la variedad PAU871 no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo, las cepas 10R y 55T provocaron una elongación de la radícula de un 24% y 44 % respectivamente en relación a los controles (Tabla 4). En la variedad NK940, a excepción de la cepa 50T de *R. terrigena* que no demostró diferencias significativas con el control, todas las demás cepas inhibieron significativamente la elongación de la radícula (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de la inoculación con bacterias diazotórfas en la elongación de la radícula de semillas de maíz de las variedades PAU871 y NK940.

Tratamiento	Largo de la radícula (cm)*	
	NK940	PAU871
Control	2,89 a	0,82 sd
<i>Raoultella terrigena</i> 10R	1,93 bc	1,02 sd
<i>Raoultella terrigena</i> 32R	2,05 b	0,94 sd
<i>Raoultella terrigena</i> 50T	2,73 a	0,86 sd
<i>Ochrobactrum</i> sp. 55T	1,61 cd	1,18 sd
<i>Enterobacter</i> sp. 59T	0,93 e	0,88 sd
<i>Pseudomonas</i> sp. 70T	1,31 de	0,92 sd
<i>Pseudomonas</i> sp. 79s	1,51 d	0,92 sd
<i>Enterobacter</i> sp. 87s	0,95 e	0,62 sd

*Los valores representan la media de 5 semillas de PAU871 y de 8 semillas de NK940 germinadas en placas de agar agua incubadas a 28°C durante 48 h.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (Fisher $p < 0,05$).

Estos resultados sugieren que, el efecto de la inoculación en la elongación de las raíces depende del genotipo de las bacterias pero también del genotipo vegetal. Aunque, para verificar esto, deberían realizarse más repeticiones de los ensayos.

El crecimiento de la raíz principal y de las raíces laterales produce un aumento de la superficie de absorción de las plantas, lo que favorece el intercambio de nutrientes. Muchos autores han reportado la capacidad de las PGPRs de potenciar estos cambios morfológicos en los sistemas radiculares de los cultivos (Kapulnik *et al.*, 1985; de-Bashan *et al.*, 2007; Spaepen *et al.*, 2008).

La elongación de la radícula podría atribuirse a la producción de algún metabolito bacteriano como el ácido indol acético (AIA). En las condiciones ensayadas, la inoculación no provocó en ninguno de los casos, un crecimiento significativo en el largo de la radícula en relación a las semillas no inoculadas. A pesar de que las cepas en estudio poseen la capacidad de producir AIA (Tabla 1), puede ser que no lo estén expresando en estas condiciones, o que en vez de provocar el crecimiento de la raíz principal provoquen un aumento de

raíces laterales y adventicias, lo cual debería ser determinado en otro tipo de ensayos. Xie *et al.*, (1996) indican que la producción de AIA por las bacterias en bajas cantidades promueve la elongación de la raíz principal, mientras que cantidades altas de AIA provocan el aumento de la formación de raíces laterales y adventicias pero inhiben el crecimiento de la raíz principal. Las bacterias del presente estudio son productoras de AIA (Tabla 1), en las condiciones del presente ensayo en la variedad NK940 pudieron haber producido altas concentraciones de AIA lo cual podría explicar el efecto inhibitorio observado sobre las raíces principales de dicha variedad.

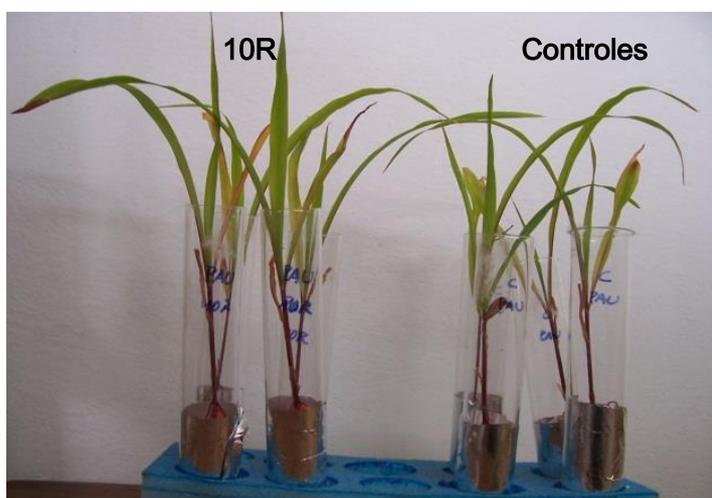
Por otra parte, Kapulnik *et al.*, (1985) determinaron que las concentraciones bacterianas de *Azospirillum* spp. de 10^5 - 10^6 ufc/ml potencian el desarrollo de las raíces, mientras que altas concentraciones (10^8 - 10^9 ufc/ml) inhiben el desarrollo de las raíces. Dado que en este ensayo las semillas fueron inoculadas con una concentración de 10^9 células/ml, los resultados obtenidos podrían ser explicados por las altas concentraciones de inóculo utilizadas. Deberían realizarse otros ensayos para determinar si la inoculación con concentraciones menores de estas cepas potencian el desarrollo radicular.

4.5 Efecto de la inoculación en el crecimiento de plantas de maíz:

4.5.1 Ensayo con plantas crecidas en condiciones gnotobióticas

Para conocer la capacidad de las bacterias en estudio de promover el crecimiento vegetal de plantas de maíz se comenzó por evaluar el efecto de la inoculación en condiciones controladas (Figura 2). Este ensayo consistió en un screening inicial para seleccionar las PGPRs con mayor potencial.

Figura 2. Plantas de maíz de la variedad PAU871 con 15 días de crecimiento en condiciones gnotobióticas. Las plantas de la izquierda fueron inoculadas con la cepa 10R de *R. terrigena*, mientras que las de la derecha corresponden a plantas controles (sin inocular).



Para los parámetros peso seco aéreo y radical, el análisis de la varianza demostró diferencias significativas entre las variedades PAU871 y NK940, y también fue significativa la interacción cepa-variedad. Por lo que se puede afirmar que los efectos de la inoculación dependen del genotipo de las bacterias y de las plantas. Debido a esto, las diferencias entre los tratamientos fueron analizadas en cada variedad de maíz por separado (Gráfico 1).

En plantas de la variedad PAU871, la inoculación con la cepa 10R de *R. terrigena* provocó un aumento del 28% de la biomasa aérea, siendo la única cepa que mostro diferencias significativas respecto al tratamiento sin inocular (Figura 2 y Gráfica 1A). No se encontraron diferencias significativas en el crecimiento radical entre plantas inoculadas y sin inocular (Gráfico 1A).

Por el contrario, en la variedad NK940, la cepa 87S de *Enterobacter* sp. provocó un aumento del 20% en la biomasa aérea, siendo la única que presentó diferencias significativas con el control. Tampoco se observó promoción del crecimiento radical por las cepas en esta variedad. En NK940, la cepa 10R apenas promovió el crecimiento de la parte aérea en un 5%, sin diferencias significativas con el control (Gráfico 1B). Existen reportes de resultados similares en la bibliografía que indican que la capacidad de las cepas de promover el crecimiento vegetal depende del genotipo de la planta (García de Salomone y Döbereiner, 1996; Govindarajan *et al.*, 2008; Montañez *et al.*, 2012; Santi *et al.*, 2013).

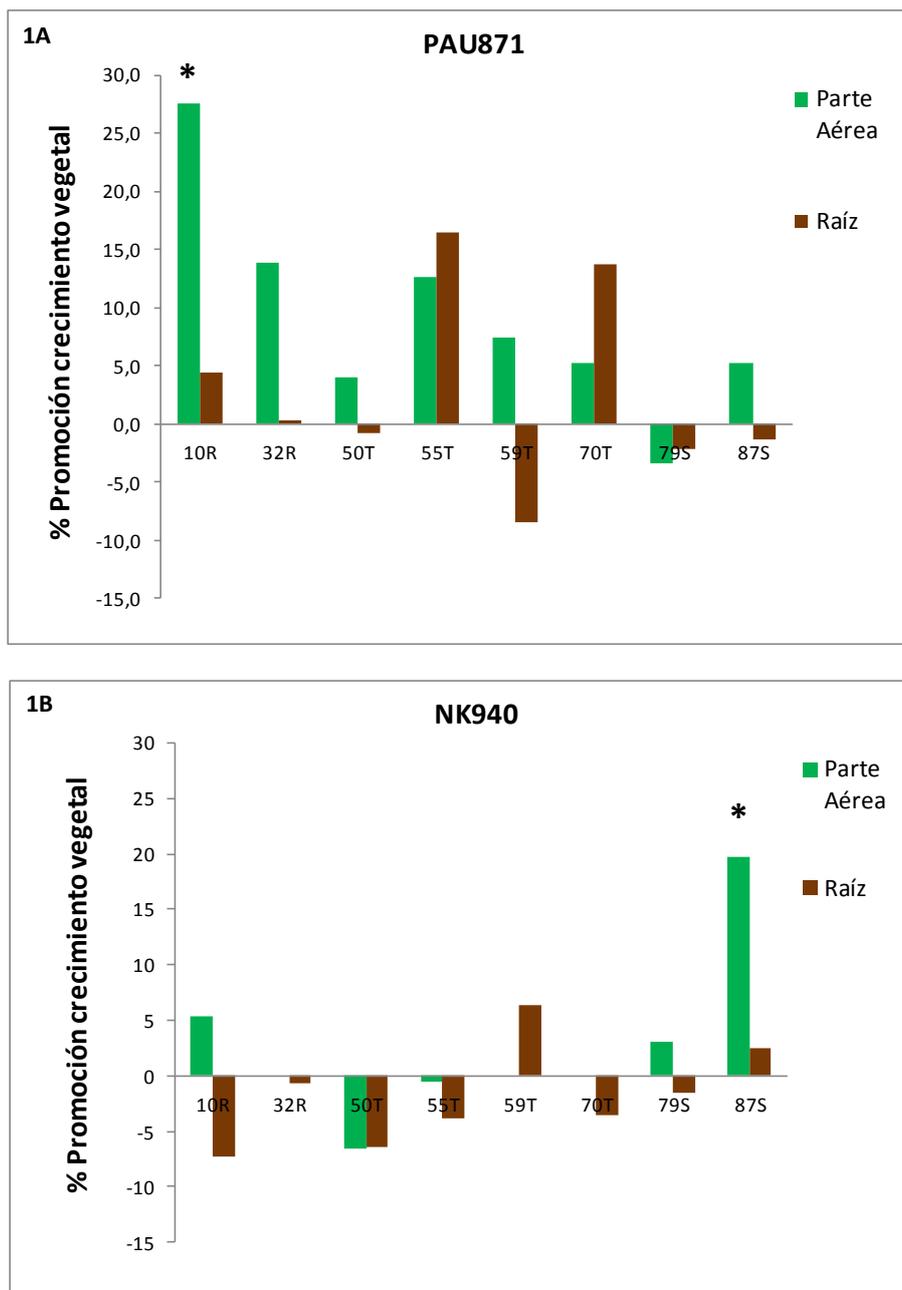


Gráfico 1. Efecto de la inoculación con las cepas seleccionadas en el crecimiento de plantas de maíz de las variedades PAU871 (1A) y NK940 (1B) crecidas en condiciones gnotobióticas durante 15 días (n=5). Los resultados se expresan como porcentaje del peso seco de plantas inoculadas en función del peso seco de las no inoculadas (controles).

* Indica diferencias significativas con las plantas controles (Fisher $p < 0,05$).

En este ensayo no se inocularon las semillas como en el ensayo anterior, sino que se inocularon las plántulas de ambas variedades luego de 3 días de sembradas. Los resultados sugieren que tal vez este método sea más apropiado y permita obtener mejores respuestas de las plantas, ya que como se observó la inoculación de las semillas puede provocar una inhibición del

desarrollo radicular (Tabla 4). De todos modos, como cualquiera de los ensayos realizados en condiciones gnotobióticas, se deben tener en cuenta los factores que pueden estar alterando el comportamiento de las cepas y de las plantas. En estas condiciones, tanto las plantas como las bacterias pueden sufrir distintos tipos de estrés o cambios dado que no se encuentran en su hábitat natural. Como se mencionó anteriormente, este ensayo sirvió como *screening* inicial para la selección de cepas y permitió evaluar el comportamiento de las variedades de maíz en estudio.

4.5.2 Efecto de la concentración del inóculo en el crecimiento de plantas de maíz creciendo con y sin fertilización nitrogenada

De los resultados obtenidos en el ensayo previo se optó por evaluar los efectos de la inoculación en plantas de maíz de la variedad PAU871, variando el aporte de nitrógeno y la concentración de las bacterias inoculadas. Estas evaluaciones se realizaron con la cepa 10R *R. terrigena*, y con la cepa 59T *Enterobacter* sp. (Gráfico 2). La cepa 10R fue elegida debido a los efectos de promoción del crecimiento observados en el ensayo previo. Por su parte, la cepa 59T fue seleccionada debido a observaciones realizadas en ensayos anteriores (datos no mostrados) en los que se observó una tendencia de la cepa a inhibir el crecimiento de las plantas de PAU871, además fue elegida dado que se corresponde a un género diferente al de la cepa 10R.

Las plantas controles que fueron fertilizadas con N50 presentaron valores de peso seco aéreo y radicular significativamente superiores a las plantas inoculadas y no fertilizadas (Gráfico 2A y 2B). Esto indicaría que la inoculación con estas dos cepas no fue suficiente para igualar el crecimiento vegetal producido por la fertilización nitrogenada.

Por otro lado, entre las plantas sin fertilizar, no se encontraron diferencias significativas entre las plantas inoculadas y los controles (Gráfico 2A y 2B). Estos resultados se contraponen a los obtenidos en condiciones gnotobióticas, en el que la inoculación con 10^9 bacterias/ml de la cepa 10R promovió significativamente el desarrollo de la parte aérea en plantas de la variedad PAU871 (Gráfico 1). Se debe tener en cuenta que las condiciones de ambos

ensayos fueron diferentes. En el presente ensayo, las plantas fueron crecidas en macetas con una mezcla de arena:vermiculita estéril y regadas con solución nutritiva (Farheüs estéril), mientras que en el anterior fueron crecidas en tubos con medio semisólido (Farheüs estéril). Esto sugiere que las bacterias pudieron mostrar comportamientos variables de acuerdo a las condiciones de crecimiento de las plantas. Factores como la movilidad de las bacterias, la disponibilidad de nutrientes y la adhesión de las bacterias a las raíces, pudieron haber afectado la colonización de las plantas en la mezcla arena:vermiculita.

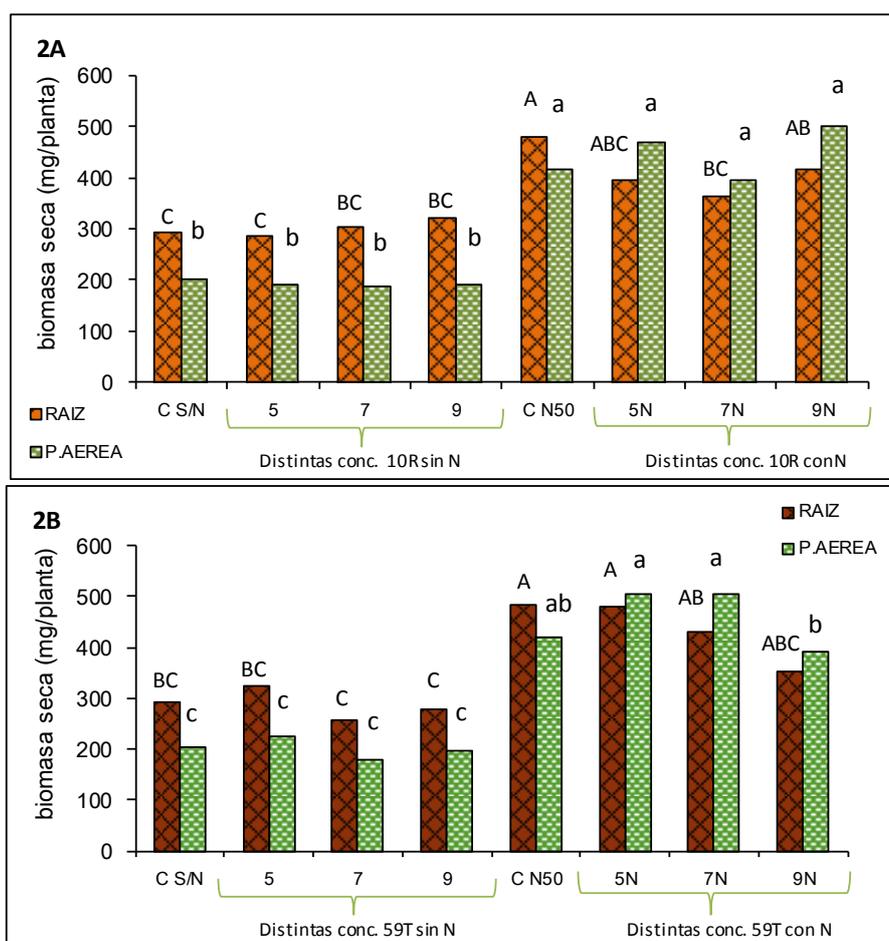


Gráfico 2. Biomasa producida por plantas de maíz de la variedad PAU871 inoculadas con distintas concentraciones de las cepas 10R (gráfico 2A) y 59T (gráfico 2B), crecidas en arena:vermiculita con y sin el agregado de nitrógeno en el momento de la siembra.

C S/N: controles (sin inocular) y sin fertilizar con nitrógeno; CN50: controles (sin inocular) y fertilizados con N50 (equivalente a 50 Kg de Nitrógeno/há); 5: plantas inoculadas con 10^5 células/mL; 7: plantas inoculadas con 10^7 células/mL; 9: plantas inoculadas con 10^9 células/mL; 5N: plantas inoculadas con 10^5 células/mL y fertilizadas con N50, 7N: plantas inoculadas con 10^7 células/ml y fertilizadas con N50, 9N: plantas inoculadas con 10^9 células/mL y fertilizadas con N50. Letras mayúsculas y minúsculas indican diferencias significativas en la biomasa seca radicular y aérea respectivamente (Fisher $p < 0,05$).

En cuanto a la concentración del inóculo, las plantas fertilizadas e inoculadas con 10^5 y 10^7 bacterias/mL de la cepa 59T, presentaron los valores más altos de biomasa aérea y distintos estadísticamente de las plantas inoculadas con 10^9 bacterias/mL de la cepa 59T (Gráfico 2B). Mientras que la inoculación con distintas concentraciones de la cepa 10R no provocó diferencias en la biomasa aérea seca de plantas fertilizadas (Gráfico 2A). Los resultados demuestran que los efectos de la inoculación en las plantas varían con la concentración del inóculo, y que esta variación además depende de la cepa bacteriana utilizada. La inoculación con poblaciones elevadas de la cepa 59T provocó una inhibición del crecimiento vegetal mientras que para la cepa 10R no se observan diferencias.

Las altas concentraciones de compuestos nitrogenados pueden reprimir la transcripción de los genes que codifican para la nitrogenasa (Frioni, 2006). Muchos estudios reportan diversos efectos de la fertilización nitrogenada en los microorganismos que promueven el crecimiento vegetal y en sus efectos de promoción. En algunos casos la inoculación con *A. brasilense* produjo efectos positivos solo cuando el N fue aplicado en un rango de concentraciones de bajas a medias (Dobbelaere *et al.*, 2001). Se ha observado que el aporte de nitrógeno sintético disminuye el número de bacterias diazótroficas, produciendo un impacto negativo sobre las comunidades microbianas diazótroficas (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1999; dos Reis Junior *et al.*, 2000; Roesch *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2012). Por otro lado, se han observado efectos positivos de la fertilización nitrogenada; Riggs *et al.*, (2001) observaron que la inoculación con *H. seropedicae* produce un mayor aumento en la producción del maíz cuando se aplica fertilizante. Un amplio rango de diazótroficos que incluye cepas de *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azorhizobium*, *Bacillus*, *Herbaspirillum* y *Klebsiella* pueden complementar el uso de urea en la producción de trigo, tanto por FBN como por promoción del crecimiento (Kennedy *et al.*, 2004). En este sentido, sería de interés la realización de más ensayos de este tipo, variando las concentraciones de inóculo, las cepas, las variedades de maíz y las dosis de N. Además, la realización de dichos ensayos en condiciones más similares al

crecimiento del cultivo, determinando interacciones planta-microorganismo más favorables y beneficiosas para la producción de maíz.

4.5.3 Ensayo con plantas de maíz crecidas en macetas con suelo

El ensayo consistió en evaluar el efecto de la inoculación con distintas cepas en plantas de maíz de las variedades en estudio creciendo en suelo (condiciones no estériles).

4.5.3.1 Promoción del crecimiento vegetal

Como se observa en el Gráfico 3 la respuesta a la inoculación fue diferente en las dos variedades, en la variedad PAU871 la inoculación con las distintas cepas provocó un aumento en la producción de biomasa aérea de entre un 15 y un 34% respecto al control mientras que en la variedad NK940 los resultados fueron muy variables, dos cepas promovieron el crecimiento vegetal mientras que otras no afectaron o inhibieron el desarrollo de la parte aérea. Los análisis estadísticos se realizaron considerando las variedades de maíz por separado.

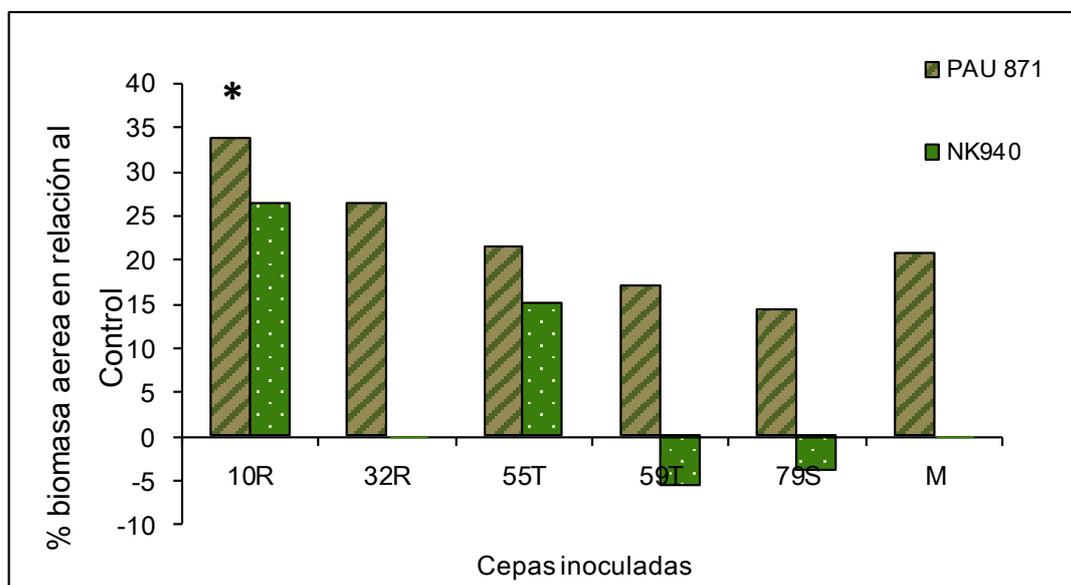


Gráfico 3. Biomasa aérea producida por plantas de maíz de las variedades PAU871 y NK940 inoculadas con cepas seleccionadas y una mezcla de las cepas. Los resultados se expresan como porcentaje de peso seco de la parte aérea en relación al peso seco de las plantas controles. M: plantas inoculadas con la mezcla de las 5 cepas seleccionadas; C: plantas controles, sin inocular.

*Indica diferencias significativas del tratamiento en relación a plantas controles (Fisher $p < 0,05$).

Solo se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en plantas de la variedad PAU871, donde la inoculación con la cepa 10R produjo un incremento del 34% de la biomasa aérea seca respecto a los controles (Gráfico 3). Es de destacar que en la variedad NK940 esta cepa produjo un incremento del 26 % en la biomasa aérea seca, aunque sin diferencias significativas con los controles.

No se encontraron diferencias significativas entre los valores de biomasa radicular de plantas inoculadas y controles en ambas variedades de maíz (datos no mostrados). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el ensayo en condiciones gnotobióticas, donde el único tratamiento que demostró diferencias significativas con las plantas controles en la variedad PAU871, fue el inoculado con la cepa 10R *Raoultella terrigena* (Gráfico 1A). Esta cepa podría tener potencial en la promoción del crecimiento de maíz.

Por otro lado, se observó que los efectos de la inoculación varían según las condiciones en las que se realiza el ensayo. En el ensayo realizado en macetas con arena:vermiculita la inoculación con la cepa 10R no fue eficaz y no produjo diferencias significativas con los controles. Las causas de éxito de la inoculación en este ensayo, cuyas condiciones se asemejan más a las naturales, donde las plantas se desarrollaron en macetas con suelo pudieron haber sido varias: las condiciones de crecimiento fueron más similares a las naturales, las plantas se encontraban menos estresadas dado que contaban con suelo y más nutrientes, el espacio no era tan reducido y las raíces podían crecer sin obstáculos, las plantas crecieron por más tiempo y probablemente los efectos de promoción del crecimiento por la cepa se observen en estadios más adelantados en el desarrollo vegetal, o la influencia de la doble inoculación (dado que en este ensayo se inoculó la semilla y luego las plantas a los 15 días).

4.5.3.2 Recuento de fijadores de nitrógeno en plantas de maíz de distintas variedades inoculadas con bacterias seleccionadas

Con el objetivo de demostrar si la inoculación provoca un cambio en el número de diazótrofes asociados a las plantas de maíz, se realizó el recuento de

diazótrofos rizosféricos y endófitos de raíz de plantas de las variedades PAU871 y NK940 crecidas en macetas con suelo. Se empleó el método de número más probable (NMP) en un medio semisólido sin N combinado (JNFb).

Las poblaciones de diazótrofos variaron entre 10^4 y 10^6 por gramo de muestra en ambas variedades de maíz, y en general la población de diazótrofos rizosféricos fue mayor que la de endófitos de raíces (Gráfico 4A y 4B).

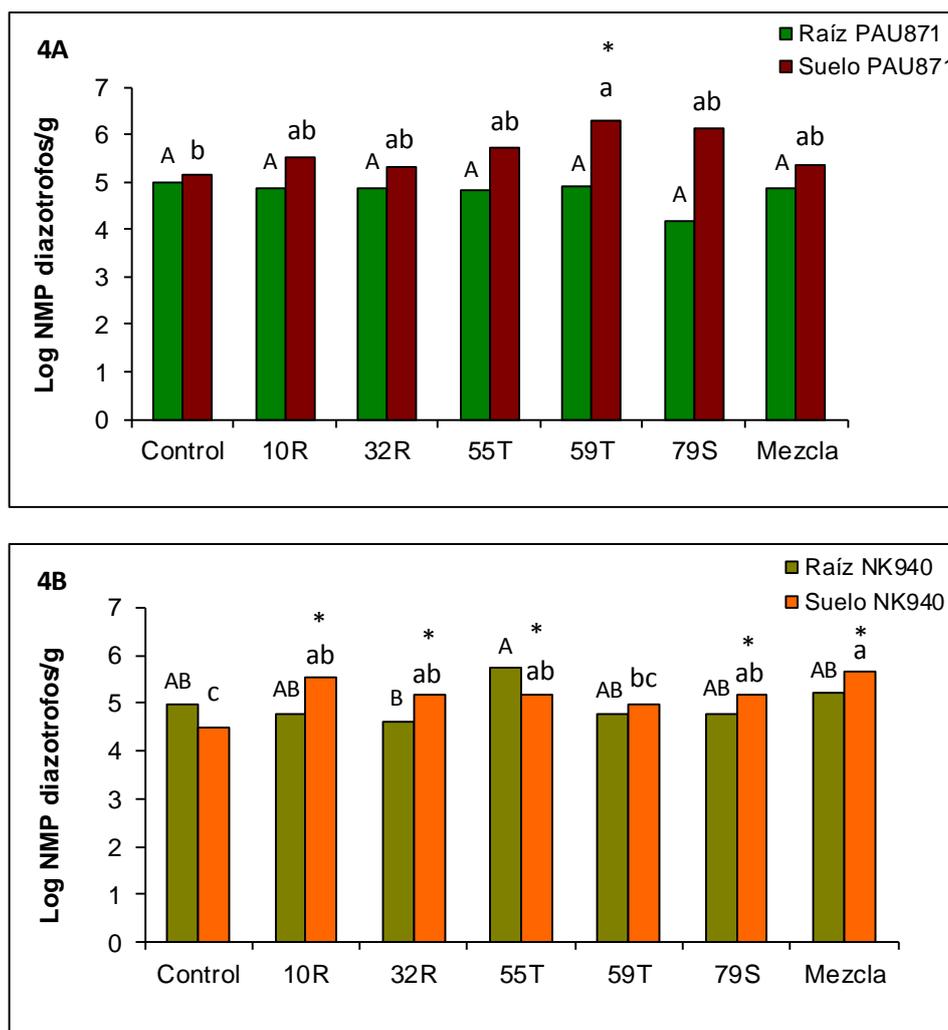


Gráfico 4. Número de bacterias diazótrofes (endófitas y rizosféricas) por gramo de raíz o de suelo rizosférico de plantas de maíz inoculadas con distintas cepas de estudio y sin inocular. 4A) Recuentos de plantas de la variedad PAU871. 4B) Recuentos de plantas de la variedad NK940.

Letras diferentes en mayúscula y minúscula indican diferencias significativas del NMP de endófitos y rizosféricos respectivamente entre los tratamientos y controles en cada variedad de maíz (Fisher $p < 0,05$).

* Diferencias significativas entre el NMP de rizosféricos de plantas inoculadas con respecto al NMP de rizosféricos de plantas controles.

El número de diazótrofos endófitos varió entre 10^4 y 10^6 por gramo de raíz. El análisis de varianza no presentó diferencias significativas en el NMP de endófitos, ni entre los tratamientos, ni entre las variedades de maíz y no se detectó una interacción cepa-variedad.

En cuanto al recuento de diazótrofos rizosféricos, se observaron poblaciones de entre 10^5 y 10^6 por gramo de suelo rizosférico. El análisis estadístico demostró diferencias entre las variedades de maíz observándose que el número de diazótrofos rizosféricos fue mayor en plantas de la variedad PAU871. Por otro lado, no se observó una interacción significativa cepa-variedad, tampoco se encontraron diferencias significativas entre las plantas inoculadas con las distintas cepas, y tampoco se encontraron diferencias entre las plantas inoculadas y sin inocular. Estos resultados coinciden con los de varios autores que han determinado mayor concentración de bacterias en la rizósfera que en los tejidos internos de las plantas (Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado, 2003; Rosenblueth y Martínez-Romero, 2004; Cavaglieri *et al.*, 2009).

Las menores densidades de endófitos encontradas, puede ser explicada por la lenta migración de las bacterias en las plantas. Liu *et al.*, (2006) estudiaron la colonización de plantas de maíz y arroz por *Bacillus megaterium*, observando que las bacterias migran lentamente desde raíces a tallos y luego a hojas.

Dado que en el análisis estadístico realizado mostró diferencias significativas entre las variedades de maíz, se realizó nuevamente el análisis de los recuentos analizando cada variedad por separado. No se encontraron diferencias significativas entre el NMP de endófitos de plantas inoculadas y de plantas sin inocular (Gráfico 4A y 4B). Sin embargo, en ambas variedades de maíz, el recuento de bacterias rizosféricas fue siempre mayor en plantas inoculadas que en las plantas sin inocular, mostrando diferencias significativas con algunos tratamientos (Gráfico 4A y 4B). Esto sugiere que la inoculación con estas cepas provocó un aumento del número de diazótrofos rizosféricos en las plantas de maíz, pero no tuvo efectos sobre la abundancia de endófitos en las raíces de maíz. Si bien la mayoría de estas bacterias fueron aisladas de raíces y tallos de plantas de maíz, este resultado podría indicar que estas bacterias no tienen la capacidad de colonizar activamente las raíces y establecerse como

endófitas, o que la inoculación con estas cepas podría modificar la estructura de las comunidades endófitas en términos de diversidad pero no de abundancia.

Distintos factores influyen en la composición cuantitativa y cualitativa de los microorganismos en la rizósfera y tejidos internos de las plantas. Entre estos pueden influir las características propias de cada cepa o especie, relacionadas con sus capacidades fisiológicas y metabólicas, o factores externos a las bacterias más bien relacionados con las características de las plantas huéspedes, del suelo y otros factores abióticos.

El hecho de que el número de endófitos en las raíces se mantiene en concentraciones similares en todos los tratamientos inoculados y en plantas controles, y no así el número de diazótrofes rizosféricos, podría indicar que las plantas regulan el número de microorganismos endófitos mediante mecanismos de defensa. Las variedades de maíz utilizadas en esta tesina pueden poseer mecanismos de defensa y la capacidad de frenar el ingreso y la reproducción de los microorganismos en sus tejidos, explicando de este modo la constancia del número de endófitos en las plantas a pesar de los tratamientos de inoculación.

El mayor número de microorganismos rizosféricos podría ser explicado por la liberación de exudados radicales. Varios autores indican que la cantidad y calidad de exudados radicales influyen en gran medida en las poblaciones microbianas (Rengel, 1997; Lugtenberg *et al.*, 2001; Mehnaz y Lazarovits, 2006), dado que pueden llegar a contener entre 10-44% del carbono asimilado y otra serie de compuestos, que contribuyen al aumento del número de microorganismos rizosféricos (Calvo-Vélez *et al.*, 2008; Compant *et al.*, 2010).

Por otro lado, las plantas también cuentan con poblaciones nativas en sus tejidos, las que podrían interaccionar de diversas formas con las bacterias utilizadas en la inoculación, compitiendo con ellas en la colonización de las raíces.

En los ensayos de inoculación realizados hasta el momento se ha observado que la respuesta a la inoculación depende del genotipo vegetal. En PAU871 el

tratamiento inoculado con la cepa 59T fue el único que presentó valores de diazótrofos rizosféricos significativamente superiores con respecto a las plantas controles (Gráfico 4A). Mientras que en plantas de la variedad NK940, todos los tratamientos inoculados a excepción del inoculado con la cepa 59T, aportaron valores significativamente más altos de diazótrofos rizosféricos que las plantas controles (Gráfico 4B).

Como se mencionó anteriormente, varios trabajos reportan la variabilidad de los resultados en función del genotipo vegetal (Riggs *et al.*, 2001; Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado; 2003; Jha *et al.*, 2009; Inceoglu *et al.*, 2010; Vargas *et al.*, 2012; Montañez *et al.*, 2012). En nuestro país, Montañez y Sicardi, (2013) realizaron ensayos de inoculación en condiciones de invernáculo con los mismos genotipos de maíz de esta tesina PAU871 y NK940, además de otro genotipo llamado Maizon. Los resultados demostraron diferencias significativas entre los cultivares y tratamientos de inoculación, en el peso seco de la parte aérea y radicular y en el contenido de N y porcentaje de N derivado de la atmósfera. El genotipo NK940 no demostró respuesta a la inoculación. Sería útil emplear esta técnica en plantas inoculadas con las cepas evaluadas en esta tesina para determinar si efectivamente aportan N a las plantas mediante la FBN.

Los resultados obtenidos en esta tesina muestran una interacción cepa-variedad. Como se mencionó previamente, esta interacción quizás se deba a las diferencias en los exudados radicales de las dos variedades en estudio o a las diferentes respuestas de defensa de las plantas.

A su vez se podría realizar un análisis cuantitativo más sensible, aplicando la técnica de qPCR del gen *nifH* de modo de evaluar la dinámica de las comunidades diazótrofes durante el crecimiento de las plantas.

4.5.3.3 Estructura de la comunidad de diazótrofes en plantas de la variedad PAU871 mediante la técnica de T-RFLP

El objetivo de esta actividad fue determinar si la inoculación con las bacterias seleccionadas provoca un cambio en la composición de la comunidad de diazótrofes endófitos y/o rizosféricos. Se evaluó la estructura y diversidad de las comunidades diazótrofes de plantas de la variedad PAU871 mediante la técnica de T-RFLP amplificando el gen *nifH* y digiriéndolo con la enzima *HhaI*. Se eligió esta variedad de maíz dado que se observó una respuesta positiva a la inoculación en el ensayo de macetas con suelo. El método de T-RFLP permitió determinar similitudes y diferencias en la estructura de las comunidades de los tratamientos inoculados y sin inocular (controles).

La PCR anidada del gen *nifH* de las muestras de suelo y de raíces obtenidas de las plantas crecidas en macetas generaron amplicones de 360 pb (tamaño esperado), pero también se observaron algunas bandas inespecíficas; motivo por el cual las bandas correspondientes al gen *nifH* fueron purificadas utilizando un kit de purificación de gel (Figura 3).

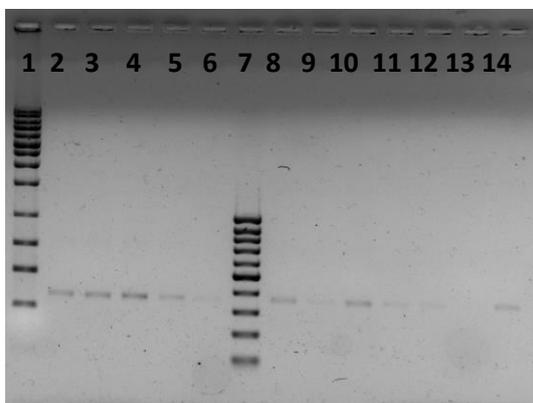


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación del gen *nifH*. Carril 1: Marcador molecular 1 Kb. Carriles 2-6 amplificados de suelo de los tratamientos Control3, 10R3, 55T3, 59T3 y 79S2. Carril 7: Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas). Carriles 8-14 amplificados de endófitos de raíz de Control2, 55T1, 55T2, 59T1, 59T2, 79S2 y 79S3. Los números 1, 2 y 3 indican las repeticiones de cada tratamiento.

Se obtuvieron los electroferogramas y se realizó el análisis de los datos como se menciona en Materiales y Métodos.

La media del número de fragmentos terminales marcados (T-RFs) en cada tratamiento, expresado como el índice de riqueza (S), varió entre 10 y 13 en las muestras de suelo rizosférico y entre 3 y 11 en las muestras de raíces desinfectadas superficialmente (Tabla 5). En cada tratamiento, la riqueza de diazótrofes rizosféricos fue mayor que la de endófitos de raíces (Tabla 5).

Por otro lado, observando los valores de los índices de Shannon (H), se puede apreciar que la diversidad en las comunidades rizosféricas fue mayor que en las endófitas de raíces (Tabla 5). Este resultado coincide con lo que ha sido extensamente reportado en la bibliografía, que las comunidades en la rizósfera son más diversas dado que solo algunos endófitos son reclutados de un gran pool de especies y clones del suelo (Germida *et al.*, 1998; Sessitsch *et al.*, 2002; Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006; Hardoim *et al.*, 2008). Solo ciertas bacterias tienen la capacidad de colonizar y de ser competitivas frente a la microflora nativa que reside en las plantas y en el suelo. Como se mencionó anteriormente, factores bióticos y abióticos influyen en gran medida en la diversidad de bacterias en la rizósfera y tejidos internos de las raíces de maíz.

Tabla 5. Índice de riqueza (S) y de diversidad de Shannon (H) en la rizósfera y en el interior de raíces de plantas de maíz de la variedad PAU871 inoculadas y sin inocular (controles)

Tratamiento	S	H
Control suelo	13	2,6
Control raíz	7	1,9
10R suelo	12	2,5
10R raíz	11	2,4
55T suelo	10	2,3
55T raíz	4	1,4
59T suelo	10	2,3
59T raíz	5	1,6
79s suelo	11	2,4
79s raíz	3	1,1

Es de destacar que las plantas inoculadas con la cepa 10R presentaron el mayor índice de riqueza en las comunidades endófitas, casi el mismo valor que en la rizósfera. Además, la inoculación con la cepa 10R fue el único tratamiento que produjo un aumento de la riqueza y la diversidad de endófitos en relación a las plantas controles.

El análisis de cluster formó dos grupos: uno está integrado por las comunidades rizosféricas y otro por las comunidades endófitas de raíces de maíz (Figura 4). Las comunidades rizosféricas de los distintos tratamientos presentaron 60% de similitud entre ellas, agrupándose en ese cluster las comunidades de las plantas inoculadas y plantas controles. Por otro lado, las comunidades endófitas se agruparon en otro cluster mostrando solo un 20% de similitud entre ellas (Figura 4).

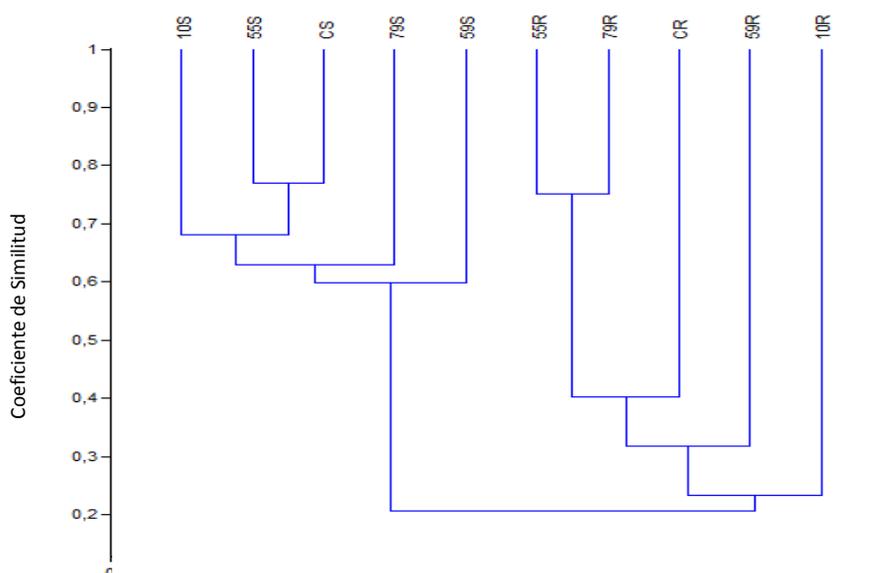


Figura 4. Análisis de cluster basado en similitud de Jaccard de los datos obtenidos por T-RFLP del gen *nifH* digerido con *HhaI* de las muestras de suelo y de endófitos de raíz de plantas maíz de la variedad PAU871 inoculadas con las cepas seleccionadas y sin inocular. 10S: comunidad de diazotrofos rizosféricos de plantas inoculadas con la cepa 10R; 55S: comunidad de diazotrofos rizosféricos de plantas inoculadas con la cepa 55T; 59S: comunidad de diazotrofos rizosféricos de plantas inoculadas con la cepa 59T; 79S: comunidad de diazotrofos rizosféricos de plantas inoculadas con la cepa 79s; CS: comunidad de diazotrofos rizosféricos de plantas sin inocular; 10R: comunidad de diazotrofos endófitos de plantas inoculadas con la cepa 10R; 55R: comunidad de diazotrofos endófitos de plantas inoculadas con la cepa 55T; 59R: comunidad de diazotrofos endófitos de plantas inoculadas con la cepa 59T; 79R: comunidad de diazotrofos endófitos de plantas inoculadas con la cepa 79s; CR: comunidad de diazotrofos endófitos de plantas sin inocular

El análisis de cluster muestra que la inoculación no produjo grandes cambios en las comunidades rizosféricas, que mantuvieron un % de similitud elevado entre ellas. Mientras que se observaron mayores diferencias en las comunidades endófitas debido a la inoculación. Por otro lado, se observó que la comunidad de endófitos de las plantas inoculadas con la cepa 10R fue la que más se separó de la comunidad endófitas del tratamiento control y del resto de las plantas inoculadas. Sin embargo, las comunidades de suelo rizosférico de las plantas inoculadas con la cepa 10R presentaron un elevado % de similitud con las del tratamiento control. Este resultado indicaría que en la variedad PAU871 la inoculación con la cepa 10R no provocó un cambio sustancial en la estructura de la comunidad de diazotrofos rizosféricos mientras que el cambio fue mayor en la comunidad de diazotrofos endófitos.

En cuanto a la estructura de las comunidades (Tabla 6 y 7), los TRFs de 177 y 353 pb estuvieron presentes en todas las comunidades endófitas. Estos mismos TRFs se encontraron en todas las comunidades rizosféricas, además de los siguientes picos: 43, 67, 171 y 226 pb. Esto sugiere que algunos biotipos podrían hallarse solo en la rizósfera y que no son capaces de colonizar el interior de las raíces, mientras que otros si lo hacen, al menos en el tiempo y en las condiciones en que se realizó el ensayo. A su vez, el hecho de que estos picos estén presentes en todas las comunidades incluyendo plantas controles, sugiere que la inoculación no afecta a la presencia de estos TRFs y que las especies/cepas a las que corresponden estos TRFs son constantes en el cultivo del maíz.

Tabla 6. Matriz de ausencia y presencia de TRFs en las comunidades de diazotrofos endófitos en plantas de maíz de la variedad PAU871 inoculadas con cepas seleccionadas y sin inocular (control)

TRFs	10R	55T	59T	79S	CONTROL
35	1	0	0	0	0
40	1	1	0	0	0
42	1	0	1	0	1
58	1	0	0	0	0
79	1	0	0	0	0
107	0	0	0	0	1
177	1	1	1	1	1
179	0	0	1	0	0
185	1	0	0	0	1
187	0	0	1	0	0
205	1	0	0	0	0
226	0	1	0	1	1
303	1	0	0	0	0
309	1	0	0	0	0
314	0	0	0	0	1
353	1	1	1	1	1

Tabla 7. Matriz de ausencia y presencia de TRFs en las comunidades de diazotrofos rizosféricos en plantas de maíz de la variedad PAU871 inoculadas con cepas seleccionadas y sin inocular (control)

TRFs	10R	55T	59T	79S	CONTROL
43	1	1	1	1	1
67	1	1	1	1	1
72	1	0	0	0	1
171	1	1	1	1	1
174	0	0	0	0	1
176	0	0	1	0	1
177	1	1	1	1	1
185	0	0	1	1	0
220	1	1	1	0	1
226	1	1	1	1	1
305	1	0	0	0	0
307	1	1	0	1	1
314	1	0	0	0	0
353	1	1	1	1	1
355	0	1	1	1	1
357	1	1	0	1	1

Como se observa en las Tablas 6 y 7, el número total de TRFs presentes en las comunidades rizosféricas y endófitas fue de 16. Sin embargo, solo 5 TRFs: 177, 185, 226, 314 y 353 pb fueron comunes entre las comunidades rizosféricas y endófitas. Aunque se debe tener en cuenta que tal vez algunos picos no fueron lo suficientemente abundantes para ser detectados con este método (se consideraron presentes aquellos T-RFs que presentaron una abundancia relativa > al 1%)

Se observó que el TRF de 177 pb, se encuentra de forma abundante en las comunidades endófitas de plantas controles, indicando que podría ser un endófito natural y dominante en esta variedad de maíz. En el trabajo de Rodríguez-Blanco *et al.*, (2009), se correlacionó el pico de 177 pb con *Enterobacter* sp., y en esta tesina se encontró representando un alto porcentaje de la fluorescencia total de casi todos los tratamientos. El género *Enterobacter* está ampliamente distribuido en el ambiente y ha sido aislado con frecuencia a partir de suelo, rizósfera y semillas de varios tipos de plantas (Mundt y Hinkle, 1976), por ejemplo en arroz (Tan *et al.*, 2009), en algodón (McInroy y Kloepper, 1995), en maíz (Fisher *et al.*, 1992; McInroy y Kloepper, 1995; Palus *et al.*, 1996), entre otros. El pico de 177 pb (correspondiente a este género), se hizo presente en las comunidades rizosféricas con porcentajes entre 30-44%; mientras que entre diazotrofos endófitos fue variable. Este TRF presentó en promedio el 36% de la abundancia relativa en las comunidades de las plantas controles, el 57% en las comunidades de plantas inoculadas con la 59T, mientras que solo un 1% en el tratamiento inoculado con la cepa 10R, el 16% en el tratamiento inoculado con la cepa 55T, y 3% en las inoculadas con la cepa 79S. El alto porcentaje que representó el TRF de 177 pb en el tratamiento con la cepa 59T (57%), fue esperable dado que la cepa 59T pertenece al género *Enterobacter*. Se observó que la inoculación con las demás cepas provocó una disminución de la abundancia del TRF de 177 pb. En las raíces de las plantas inoculadas con la cepa 10R este TRF fue prácticamente ausente. Además, en dicha comunidad endófitas aparecieron 6 TRFs únicos, es decir que no se encontraron en las comunidades de los controles ni tampoco aparecieron en los demás tratamientos inoculados. Experimentos de competencia con endófitos han demostrado que algunos microorganismos son colonizadores

más agresivos y terminan desplazando a otros, como observaron Verma *et al.*, (2004) y Rosenblueth y Martínez-Romero, (2004). Los resultados en conjunto sugieren que la cepa de 10R *Raoultella terrigena* podría estar favoreciendo el aumento de los índices de riqueza y de diversidad de diazotrofos endófitos, debido a la disminución de las bacterias representadas por el TRF de 177 pb. Es decir, la inoculación con esta cepa, podría favorecer el establecimiento y crecimiento de otras bacterias dado que disminuye la dominancia del género *Enterobacter*. En consecuencia, esto pudo haber provocado el crecimiento de diversos endófitos que se encontraban presentes en las plantas de maíz pero en concentraciones indetectables; o esto pudo haber permitido que nuevas cepas colonicen las plantas de maíz. Sería interesante poder estudiar las hipótesis planteadas, dado que la cepa de *R. terrigena* podría estar promoviendo el desarrollo vegetal de una forma diferente a las planteadas hasta el momento. Dado que esta cepa mostró tener capacidad para promover el crecimiento vegetal en la variedad PAU871 podría, a futuro, tener una aplicación potencial en el cultivo del maíz.

5. CONCLUSIONES

Los diazotrofos de diferentes géneros, aislados de distintas zonas de las plantas de maíz de las variedades PAU871 y NK940, presentaron actividad celulolítica y pectinolítica, lo que podría estar relacionado con la capacidad de colonizar los tejidos vegetales.

Las 8 cepas fueron capaces de inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum in vitro*.

La inoculación de las semillas de maíz de las variedades PAU871 y NK940 con las cepas seleccionadas no promovió el crecimiento temprano de la radícula.

Los ensayos realizados en distintas condiciones demostraron que los efectos de la inoculación dependen en gran medida del genotipo de las bacterias y del genotipo de las plantas. La variedad de maíz PAU871 presentó mayor respuesta a la inoculación que NK940 dado que la inoculación con todas las cepas produjo el aumento de la biomasa aérea de todas las plantas, mientras que en la variedad NK940 se observaron efectos variables.

La inoculación con la cepa 10R *Raoultella terrigena* produjo un aumento significativo en la biomasa aérea de las plantas de maíz de la variedad PAU871 tanto en condiciones gnotobióticas como en macetas con suelo.

En ambas variedades, la inoculación con los diazotrofos en estudio, produjo cambios en el número de diazotrofos rizosféricos, pero no en el número de endófitos de raíces, los cuales presentaron poblaciones menores que las rizosféricas.

La técnica de T-RFLP mostró que en la variedad PAU871, las comunidades de diazotrofos rizosféricos de plantas inoculadas y controles presentaron elevada similitud entre ellas; mientras que se observaron mayores diferencias en las comunidades endófitas debido a la inoculación. La inoculación con la cepa 10R produjo cambios en la estructura de la comunidad de diazotrofos endófitos.

Conclusión general:

En este trabajo se demostró que el genotipo de las cepas, la concentración del inóculo y el genotipo de las plantas son factores que influyen sobre los efectos de la inoculación en plantas de maíz. Las combinaciones de estos y otros factores deben ser estudiadas específicamente para obtener los mejores resultados.

Entre los tratamientos ensayados la inoculación con la cepa 10R de *Raoultella terrigena* aumentó la diversidad de endófitos en plantas de maíz y promovió el crecimiento vegetal de plantas de la variedad PAU871 tanto en condiciones gnotobióticas como en condiciones no estériles con plantas crecidas en macetas con suelo. A pesar de que se necesitan llevar a cabo más ensayos de inoculación, estos resultados fueron preliminares y demuestran que la inoculación de plantas de maíz de la variedad PAU871 con la cepa 10R de *R. terrigena* promete ser una práctica eficaz para la producción del cultivo de forma sustentable.

6. PERSPECTIVAS

Las perspectivas que plantea este trabajo son:

- 1) Determinar cuál o cuales son los mecanismos involucrados en la promoción del crecimiento vegetal producida por la inoculación con la cepa 10R. En los trabajos previos a la presente tesina se determinó que la cepa 10R es capaz de fijar nitrógeno, solubilizar fosfatos y producir fitohormonas como AIA. Se deberían realizar ensayos que logren determinar si las plantas de maíz son efectivamente beneficiadas por estos mecanismos de promoción. Por otro lado, la cepa podría estar favoreciendo el desarrollo vegetal de forma indirecta mediante la interacción con la comunidad de bacterias nativas.
- 2) Profundizar los estudios sobre métodos de inoculación y concentraciones de inóculos más apropiadas.
- 3) Realizar ensayos de inoculación en invernáculo y campo con combinaciones de variedades de maíz-cepa.

7. ANEXO

7.1 Medio de cultivo JNFb semisólido libre de N para el recuento de diazótrofes por NMP

Composición (1L)	
DL- ácido málico	5.0 g
K ₂ HPO ₄	1.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.20 g
NaCl ₂ .2H ₂ O	0.012 g
FeEDTA 1.64% sol.	4.0 ml
Sol. Elementos mínimos	2.0 ml
Sol. Azul bromotimol 0.5% in 0.2 N KOH	2.0 ml
Sol. Vitamina	1.0 ml
pH	6
Agar	6.0 g

Sol. Elementos mínimos: 0.40 g CuSO₄.5H₂O; 0.12 g ZnSO₄.7H₂O; 1.40 g H₃BO₃; 1.00 g Na₂MoO₄.2H₂O; 1.50 g MnSO₄.H₂O; 1L H₂O dest.

7.2 Medio de cultivo TY

Composición (1L)	
Triptona	5,0 g
Extracto de Levadura	3,0 g
Cl ₂ Ca.2H ₂ O	0,87 g
pH	7,0
Agar	20 g

7.3 Medio de cultivo LB para determinar degradación de pectina por las cepas

Composición (1L)	
Peptona	10 g
Extracto de Levadura	5,0 g
NaCl	10 g
pH	7
Agar	20 g

7.4 Medio de cultivo PDA para ensayo de inhibición del crecimiento del hongo fitopatógeno Fusarium oxysporum in vitro

Composición (1L)	
Extracto de papa	4 g
Glucosa	20 g
Agar	15 g
pH	5,6

7.5 Solución Farheüs libre de N combinado para el crecimiento de las plantas de maíz

Composición (1L)	
CaCl ₂ (10g/l)	10 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O (12g/l)	10 ml
KH ₂ PO ₄ (10 g/l)	10 ml
Na ₂ PO ₄ .2H ₂ O (15g/l)	10 ml
FeC ₆ H ₆ O ₇ (0,5 g/l)	10 ml
Sol. Micronutrientes	1,0 ml
Agar	7,5 g
pH	7

Sol. Micronutrientes: 0,40 g CuSO₄.5H₂O; 0,12 g ZnSO₄.7H₂O; 1,40 g H₃BO₃; 1 g Na₂MoO₄.2H₂O; 1,50 g MnSO₄.H₂O; 1L H₂O dest.

8. BIBLIOGRAFIA

- Adesemoye A.O., Torbert H.A., Kloepper J.W. (2008). Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. *Can. J. Microbiol.* 54: 876-886.
- Ahmed S., Ahmad M. (2006). Effect of Insecticides on the total number of soil bacteria under laboratory and field conditions. *Pak. Entomol.* 28: 63-68.
- Anandhakumar J., Zeller W. (2008). Biological control of red stele (*Phytophthora fragariae* var. *fragariae*) and crown rot (*P. cactorum*) disease of strawberry with rhizobacteria. *J. Plant Dis. Protect.* 115: 49-56.
- Anderson A.J., Guerra D. (1985). Responses of bean to root colonization with *Pseudomonas putida* in a hydroponic system. *Phytopathology.* 75: 992-995.
- Arshad M., Frankenberger W.T. Jr. (1998). Plant-growth regulating substances in the rhizosphere: Microbial production and functions. *Adv. Agron.* 62: 45-151.
- Baca B.E., Elmerich C. (2007). Microbial production of plant hormones. En: Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations. Elmerich C., Newton W.E. (Eds.). Springer, Dordrecht, Netherlands. 113-143.
- Bashan Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.* 16: 729-770.
- Bashan Y., Holguin G., de-Bashan L.E. (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.* 50: 521-577.
- Bekri M.A., Desair J., Keijers V., Proost P., Leeuwen M.S., Vanderleyden J., Broek V. (1999). *Azospirillum irakense* produces a novel type pectate lyase. *J. Bacteriol.* 181: 2440-2447.
- Beneduzi A., Peres D., Vargas L.K., Bodanese-Zanettini M.H., Passaglia L.M.P. (2008). Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Appl. Soil Ecol.* 39: 311-320.
- Benizri E., Schoeny A., Picard C., Courtade A., Gukert A. (1997). External and internal root colonization of maize by two *Pseudomonas* strains: enumeration by enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA). *Curr. Microb.* 34: 297-302.
- Berg G., Krechel A., Ditz M., Sikora R.A., Ulrich A., Hallmann J. (2005). Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure

- and antagonistic function against plant pathogenic fungi. FEMS Microbiol. Ecol. 51: 215-229.
- Bergersen F.J. (1974). Formation and function of bacteroids. En: The biology of nitrogen fixation. Quispel A. (Ed). North-Holland Publishing Company, Amsterdam. 473-498.
- Bergersen F. (1980). Methods for evaluating biological nitrogen fixation. Willey and Sons, Chichester.
- Bhattacharjee R.B., Singh A., Mukhopadhyay S.N. (2008). Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: Prospects and challenges. Appl. Microbiol. Biotechnol. 80: 199-209.
- Bremner J.M., Mulvaney C.S. (1982). Total nitrogen. En: Methods of soil analysis. Page A.L., Miller R.H., Keeney D.R. (Eds). Monograph 9, Am. Soc. Agron. Madison, Wis. 595-624.
- Buddrus-Schiemann K., Schmid M., Schreiner K., Welzl G., Hartmann A. (2010). Root Colonization by *Pseudomonas* sp. DSMZ 13134 and Impact on the Indigenous Rhizosphere Bacterial Community of Barley. Microb. Ecol. 60: 381-393.
- Burgess B.K., Lowe D.J. (1996). Mechanism of molybdenum nitrogenase. Chem. Rev. 96: 2983-3012.
- Burney J.A., Davis S.J., Lobell D.B. (2010). Greenhouse gas mitigation by agricultural intensification. Proc. Natl. Acad. Sci. 107: 12052-12057.
- Byrnes B.H. (1990). Environmental effects of N fertilizer use: an overview. Fertil. Res. 26: 209-215.
- Caballero-Mellado J., Martínez-Aguilar L., Paredes-Valdez G., Estrada de los Santos P. (2004). *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 1165-1172.
- Calvo-Vélez P., Reymundo-Meneses L., Zúñiga-Dávila D. (2008). Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. Ecol. Apl. 7: 141-148.
- Carrillo A.E., Li C.Y., Bashan Y. (2002). Increased acidification in the rhizosphere of cactus seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. Naturwissenschaften 89: 428-432.
- Cavaglieri L., Orlando J., Etcheverry M. (2009). Rhizosphere microbial community structure at different maize plant growth stages and root locations. Microbiol. Res. 164: 391-399.

- Coelho M.R., Marriel I.E., Jenkins S.N., Lanyon C.V., Seldin L., O'Donnell A.G. (2009). Molecular detection and quantification of *nifH* gene sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer. *App. Soil Ecol.* 42: 48-53.
- Compant S., Duffy B., Nowak J., Clément C., Barka E.A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4951-4959.
- Compant S., Clément C., Sessitsch A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil. Biol. Biochem.* 42: 669-678.
- Cornelis P., Matthijs S. (2002). Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. *Environ. Microbiol.* 4: 787-798.
- Couillerot O., Poirier M.A., Prigent-Combaret C., Mavingui P., Caballero-Mellado J., Moëne-Loccoz Y. (2010). Assessment of SCAR markers to design real-time PCR primers for rhizosphere quantification of *Azospirillum brasilense* phytostimulatory inoculants of maize. *J. Appl. Microbiol.* 109: 528-538.
- Chelius M.K., Triplett E.W. (2000a). Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumonia* in association with *Zea mays* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 783-787.
- Chelius M.K., Triplett E.W. (2000b). Diazotrophic endophyte associated with maize. En: *Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for the Analysis of a Biological Process*. Triplett E.W. (Ed.). Horizon Scientific Press, Norfolk, UK. 779-792.
- Chen Y.B., Dominic B., Mellon M.T., Zehr J.P. (1998). Circadian rhythm of nitrogenase gene expression in the diazotrophic filamentous nonheterocystous cyanobacterium *Trichodesmium* sp. strain IMS 101. *J. Bacteriol.* 180: 3598-3605.
- Chen C.Y., Nace G.W., Irwin P.L. (2003). A 6x6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Methods* 55: 475-479.
- De Bashan L.E., Holguin G., Glick B.R., Bashan Y. (2007). Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. En: *Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control*

- biológico, planta-microorganismo. Ferrera-Cerrato R., Alarcon A. (Eds.). Editorial Trillas, México City, México. 8: 170-224.
- De Datta S.K., Buresh R.J. (1989). Integrated nitrogen management in irrigated rice. *Adv. Soil Sci.* 10: 143-169.
- DIEA, Dirección de Estadísticas Agropecuarias. (2011). Anuario Estadístico Agropecuario 2011. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, Uruguay. <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,583,O,S,0,MNU;E;27;7;MNU>
- DIEA, Dirección de Estadísticas Agropecuarias. (2011/2012). 'Invierno 2012'. En: Encuesta Agrícola. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, Uruguay. <http://www.mgap.gub.uy/portal/agxppdwn.aspx?7,5,27,O,S,0,5533%3BS%3B2%3B116>,
- Ding Y., Wang J., Liu Y., Chen S. (2005). Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. *J. Appl. Microbiol.* 99: 1271-1281.
- Dixon R., Kahn D. (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Rev. Microbiol.* 2: 621-631.
- Dobbelaere S., Croonenborghs A., Thys A., Ptacek D., Vanderleyden J., Dutto P., Labandera-Gonzalez C., Caballero-Mellado J., Aguirre J.F., Kapulnik Y., Brener S., Burdman S., Kadouri D., Sarig S., Okon Y. (2001). Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 871-879.
- Dobbelaere J., Gentry M.S., Hallberg R.L., Barral Y. (2003). Phosphorylation-dependent regulation of septin dynamics during the cell cycle. *Dev. Cell* 4: 345-357.
- Döbereiner J., Day J.M. Dart P.J. (1972). Nitrogenase activity in the rhizosphere of sugarcane and some other tropical grasses. *Plant Soil* 37: 191-196.
- Döbereiner J. (1995). Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil and plants. En: *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*; London Academia Press. Pp. 134-141.
- Dos Reis Junior F.B., Reis V.M., Urquiaga S., Döbereiner J. (2000). Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). *Plant Soil* 219: 153-159.
- Eady R.R. (1996). Structure-function relationships of alternative nitrogenases. *Chem. Rev.* 96: 3013-3030.

- El-Akhal M.R., Rincón A., Coba de la Peña T., Lucas M.M., El Mourabit N., Barrijal S., Pueyo J.J. (2012). Effects of salt stress and rhizobial inoculation on growth and nitrogen fixation of three peanut cultivars. *Plant Biol.* 15: 415-421.
- Elhordoy J.A., (1997). El multiuso agropecuario. Informe. El País Agropecuario, Montevideo, Uruguay. 31: 18-21.
- Eskew D.L. (1987). Use of ^{15}N in N_2 fixation and N cycling studies of Azolla. En: Azolla utilization. International Rice Research Institute. Los Baños, Philipines. 233-239.
- Evans H.J., Burris R.H. (1992). Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. En: Biological Nitrogen Fixation. Stacey G., Burris R.H., Evans H.J (Eds). Chapman and Hall, New York, USA.1-42.
- Fernández-Pascual M., Pozuelo J.M., Serra M.T., De Felipe M.R. (1988). Effects of cyanazine and linuron on chloroplast development, nodule activity and protein metabolism in *Lupinus albus* L. *J. Plant Physiol.* 133: 288-294.
- Fiedler R., Proksch G. (1984). The measurement of ^{15}N . Soil plant water relationships. M.F. L'Annunziata and J.O. Legg. (Ed). Academic Press. London UK. 233-282.
- Fisher P.J., Petrini O., Lappin-Scott H.M. (1992). The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). *New Phytol.* 122: 299-305.
- Fischer H.M. (1994). Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.* 58: 352-386.
- Franco A., Dobereiner J. (1994). Biología do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. *Summa Phytopathol.* 20: 68-74.
- Fred E.B., Baldwin I.L., McCoy E. (1932). Natural and artificial inoculation. En: Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants. University of Wisconsin-Madison Libraries Parallel Press. (Ed). Wisconsin, USA. 229-249.
- Frioni L. (2006). Fijación biológica del nitrógeno. En: Microbiología básica ambiental y agrícola. Universidad de la República-Facultad de Agronomía (Ed). Montevideo, Uruguay. 187-207.
- Fuentes-Ramírez L.E., Caballero-Mellado J., Sepúlveda J., Martínez-Romero E. (1999). Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29: 117-128.
- García De Salomone I.E, Döbereiner J. (1996). Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. *Biol. Fertil. Soils* 21: 193-196.

- García de Salomone I.E., Döbereiner J., Urquiaga S., Boddey R.M. (1996). Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the ¹⁵N isotope dilution technique. *Biol. Fert. Soils* 23: 249-256.
- Gelsomino A., Keijzer-Wolters A.C., Cacco G., Van Elsas J.D. (1999). Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Meth* 38: 1-15.
- Germida J.J., Siciliano S.D., De Freitas J.R., Seib A.M. (1998). Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiol. Ecol.* 26: 43-50.
- Giller K.E., Cadisch G. (1995). Future benefits from biological nitrogen fixation: an ecological approach to agriculture. *Plant Soil* 174: 255-277.
- Glazebrook J., Ichige A., Walker G.C. (1993). A *Rhizobium meliloti* homolog of the *Escherichia coli* peptide-antibiotic transport protein SbmA is essential for bacteroid development. *Genes Dev.* 7: 1485-1497.
- Goldstein A.H. (1986). Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *Am. J. Altern. Agri.* 1: 51-7.
- Govindarajan M., Balandreau J., Muthukumarasamy R., Kwon S.W., Weon H.Y., Lakshminarasimhan C. (2008). Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamiensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. *Microbial Ecol.* 55: 21-37.
- Gupta G., Panwar J., Akhtar M.S., Jha P.N. (2012). Endophytic Nitrogen-Fixing Bacteria as Biofertilizer. En: *Sustainable Agriculture Reviews*. Lichtfouse E. (Ed.). Springer, Dordrecht, Netherlands. 183-221.
- Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W.F., Kloepper J.W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43: 895-914.
- Halvorson A.D., Follett R.F., Bartolo M.E., Schweissing F.C. (2002). Nitrogen fertilizer use efficiency of furrow-irrigated onion and corn. *Agron. J.* 94: 442-449.
- Hamill A.S., Penner D. (1973). Chlorbromuron-carbofuran interaction in corn and barley. *Weed Sci.* 21: 335-342.
- Hardoim P.R., van Overbeek L.S., Elsas J.D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* 16: 463-471.

- Hardy R.W., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C. (1968). The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43: 1185-1207.
- Hardy R., Burns R.C., Holsten R.D. (1973). Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.* 5: 47-81.
- Head I.M., Saunders J.R., Pickup R.W. (1998). Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb. Ecol.* 35: 1-21.
- Herschkovitz Y., Lerner A., Davidov Y., Rothballer M., Hartmann A., Okon Y., Jurkevitch E. (2005). Inoculation with the plant growth promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* causes little disturbance in the rhizosphere and rhizoplane of maize (*Zea mays* L.). *Microb. Ecol.* 50: 277-288.
- Hoover T. (2000). Control of nitrogen fixation genes in *Klebsiella pneumoniae*. En: Prokaryotic Nitrogen Fixation. Triplett E.W. (Ed). Horizon Scientific Press, Norfolk, England. 131-147.
- Hungria M., Loureiro M.F., Mendes I.C., Campo R.J., Graham P.H. (2005). Inoculant preparation, production and application. En: Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment. Werner D., Newton W.E. (Eds). Springer, Netherlands. 223-253.
- Hungria M., Campo R.J., Souza E.M., Pedrosa F.O. (2010). Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* 331: 413-425.
- Hurek T., Handley L.L., Reinhold-Hurek B., Piche Y. (2002). *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15: 233-242.
- Huss-Danell K., Lundquist P.O., Ekblad A. (1989). Growth and acetylene reduction activity by intact plants of *Alnus incana* under field conditions. *Plant soil* 118: 61-73.
- Inceoglu O., Salles J.F., van Overbeek L., van Elsas J.D. (2010). Effects of plant genotype and growth stage on the betaproteobacterial communities associated with different potato cultivars in two fields. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 3675-3684.
- Idris R., Trifonova R., Puschenreiter M., Wenzel W.W., Sessitsch A. (2004). Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni

- hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. Appl. Environ. Microbiol. 70: 2667-2677.
- Idris HA., Labuschagne N., Korsten L. (2007). Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and crown rot of sorghum in Ethiopia. Biol. Control 40: 97-106.
- InfoStat versión (2008). Grupo InfoStat FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Iniguez A.L., Dong Y., Carter H.D., Ahmer B.M.M., Stone J.M., Triplett E.W., (2005). Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. Mol. Plant Microbe Interact. 18: 169-178.
- Izquierdo J.A., Nüsslein K. (2006). Distribution of extensive *nifH* gene diversity across physical soil microenvironments. Microb. Ecol. 51: 441-452.
- James E.K. (2000). Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. Field Crops Res. 65: 197-209.
- Jha B., Thakur M.C., Gontia I., Albrecht V., Stoffels M., Schmid M., Hartmann A. (2009). Isolation, partial identification and application of diazotrophic rhizobacteria from traditional Indian rice cultivars. Eur. J. Soil Biol. 45: 62-72.
- Juraeva D., George E., Davranov K., Ruppel S. (2006). Detection and quantification of the *nifH* gene in shoot and root of cucumber plants. Can. J. Microbiol. 52: 731-739.
- Kanungo P., Ramakrishnan B., Rajaramamohan Rao V. (1998). Nitrogenase activity of *Azospirillum* sp. isolated from rice as influenced by a combination of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and an insecticide, carbofuran. Chemosphere 36: 339-344.
- Kapulnik Y., Okon Y., Henis Y. (1985). Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. Can. J. Microbiol. 31: 881-887.
- Karg T., Reinhold-Hurek B. (1996). Global changes in protein composition of N_2 -fixing-*Azoarcus* sp. strain BH72 upon diazosome formation. J. Bacteriol. 178: 5748-5754.
- Kennedy I.R., Chouhury A.T.M.A., Kecskés M.L. (2004). Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems; can their potential for plant growth promotion be latter exploited? Soil Biol. Biochem. 36: 1229-1244.
- Kim K., Zhang Y.P., Roberts G.P. (1999). Correlation of activity regulation and substrate recognition of the ADP ribosyl transferase that regulates nitrogenase activity in *Rhodospirillum rubrum*. J. Bacteriol. 181: 1698-1702.

- Krechel A., Ditz M., Ulrich A., Faupel A., Hallmann J., Berg G. (2004). Bacterial life inside and outside potato roots and leaves. *Bulletin OILB/SROP* 27: 157-163.
- Kumar V., Narula B. (1999). Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *A. chroococcum* mutants. *Biol. Fertil. Soils* 28: 301-305.
- Ladha J.K., Triol A.G., Daroy M.L.G., Caldo G., Ventura W., Watanabe I. (1986). Plant associated N₂-fixation (C₂H₂ reduction) by five rice varieties and relationship with plant growth characters as affected by straw incorporation. *Soil Sci. Plant Nutr.* 32: 91-106.
- Ladha J.K., Tirol-Padre A. (1990). Standardization of acetylene reduction assay with field grown aquatic legume. *Int. Rice Res. Newsl.* 15: 16-17.
- Lin L., Li Z., Hu C., Zhang X., Chang S., Yang L., Li Y., An Q. (2012). Plant Growth-promoting Nitrogen-fixing Enterobacteria Are in Association with Sugarcane Plants Growing in Guangxi, China. *Microbes Environ.* 27: 391-398.
- Liu W.T., Marsh T.L., Cheng H., Forney L.J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4516-4522.
- Liu X., Zhao H., Chen S. (2006). Colonization of maize and rice plants by strain *Bacillus megaterium* C4. *Curr. Microbiol.* 52: 186-190.
- Logrieco A., Mule G., Moretti A., Bottalico A. (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 597-609.
- Loper J.E., Schroth M.N. (1986). Influence of bacterial source of indole-3-acetic acid of root elongation of sugar beet. *Phytopathology* 76: 386-389.
- Lucy M., Reed E., Glick B.R. (2004). Application of free living plant growth promoting rhizobacteria. *Ant. van Leew.* 86: 1-25.
- Lugtenberg B.J.J., Dekkers L.C., Bloemberg G.V. (2001). Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39: 461-490.
- MacCrady M.H. (1915). The numerical interpretation of fermentation tube results. *J. Infect. Dis.* 17: 183-212.
- Madigan M., Martinko J., Parker J. (2003). Diversidad Metabolica. En: Brock *Biología de los microorganismos*, 10th ed. Madigan M., Martinko J., Parker J. (Eds). Pearson Education, Madrid, España. 598-603.

- Martínez-Romero E. (2006). Dinitrogen-fixing prokaryotes. En: The prokaryotes, 3rd ed. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K., Stackebrandt E. (Eds). Springer, New York, USA. 2: 793-817.
- Mathieu-Daude F., Welsh J., Vogt T., McClelland M. (1996). DNA rehybridization during PCR: the FC(O)t effect and its consequences. *Nucleic Acids Res.* 24: 2080-2086.
- McInroy J.A., Kloepper J.W. (1995). Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil* 173: 337-342.
- Mehnaz S., Lazarovits G. (2006). Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microb. Ecol.* 51: 326-335.
- Mehnaz S., Weselowski B., Lazarovits G. (2007). *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 620-624.
- Melchor-Marroquín J.I., Vargas-Hernández J.J., Ferrera-Cerrato R., Etchevers-Barra J.D., Velázquez-Martínez A. (1999). Actividad de la nitrogenasa en *Gliricidia sepium* en diferentes regímenes de poda. *Terra* 17: 299-308.
- Meng X., Wang L., Long X., Liu Z., Zhang Z., Zed, R. (2012). Influence of nitrogen fertilization on diazotrophic communities in the rhizosphere of the Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Res. Microbiol.* 163: 349-356.
- Methol M. (2009). Maíz y sorgo. En: Informe semestral de coyuntura. Uruguay. www.caf.org.uy/IMG/pdf/CP_SOUTO_MAIZ_Y_SORGO.pdf
- Montañez A., Abreu C., Gill PR., Hardarson G., Sicardi M. (2009). Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ¹⁵N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. *Biol. Fertil. Soils* 45: 253-263.
- Montañez A., Blanco A.R., Barlocco C., Beracochea M., Sicardi M. (2012). Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. *Appl. Soil Ecol.* 58: 21-28.
- Montañez A., Sicardi M. (2013). Effects of inoculation on growth promotion and biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) under greenhouse and field conditions. *Basic Res. J. Agric Sci. Rev.* 2: 102-110.
- Mundt J.O., Hinkle N.F. (1976). Bacteria within ovules and seeds. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 694-698.

- Muñoz-Rojas J., Caballero-Mellado J. (2003). Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. *Microb. Ecol.* 46: 454-464.
- Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700.
- Niemi R.M., Heiskanen I., Wallenius K., Lindstrom K. (2001). Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *J. Microbiol. Meth.* 45: 155-165.
- Normand P., Bouquet J. (1989). Phylogeny of nitrogenase sequences in *Frankia* and other nitrogen-fixing microorganisms. *J. Mol. Evol.* 29: 436-447.
- Oliveira A.L.M., Urquiaga S., Döbereiner J., Baldani J.I. (2002). The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant Soil* 242: 205-215.
- Orole O.O., Adejumo T.O. (2011). Bacterial and fungal endophytes associated with grains and roots of maize. *J. Ecol. Nat. Environ.* 3: 298-303.
- Osborne B.G., Fearn T., Hindle P.H. (1993). Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis. Longman scientific and technical, Singapore.
- Palus J.A., Borenman J., Ludden P.W., Triplett E.W. (1996). A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea mays* L. *Plant Soil* 186: 135-142.
- Paul E.A. (1988). Towards the year 2000: directions for future nitrogen research. En: *Advanced in Nitrogen Cycling in Agricultural Ecosystems*. Wilson J.R. (Ed). CAB International, Wallingford, England. 417-425.
- Peoples M.B., Hebb D.M., Gibson A.H., Herridge D.F. (1989). Development of the xylem ureide assay for the measurement of nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.). *J. Exp. Bot.* 40: 535-542.
- Perin I., Martinez-Aguilar L., Castro-Gonzalez R., Estrada De Los Santos P., Cabellos-Avelar T., Guedes H.V., Reis V.M., Caballero-Mellado J. (2006). Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field grown maize and sugarcane. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3103-3110.
- Phillips D.A. (1974). Promotion of acetylene reduction by *Gluconoacetobacter diazotrophicus* obium-soybean cell associations *in vitro*. *Plant Physiol.* 54: 654-655.

- Postgate J. (1981). Microbiology of the free-living nitrogen fixing bacteria, excluding cyanobacteria. En: Current perspectives in nitrogen fixation. Gibson A.H., Newton W.E. (Eds). Elsevier/North-Holland Biomedical, Amsterdam. 217-228.
- Quecine M.C., Araújo W.L., Rossetto P.B., Ferreira A., Tsui S., Lacava P.T., Mondin M., Azevedo J.L., Pizzirani-Kleiner A.A. (2012). Sugarcane Growth Promotion by the Endophytic Bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. Appl. Environ. Microbiol. 78: 7511-7518.
- Rai R., Dash P.K., 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. Microb. Biot. 23: 853-858.
- Reinhold-Hurek B., Hurek T. (1998). Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: Identification, localization, and perspectives to study their function. Crit. Rev. Plant Sci. 17: 29-54.
- Rengel Z. (1997). Root exudation and microflora populations in rhizosphere of crop genotypes differing in tolerance to micronutrient deficiency. Plant Soil 196: 255-260.
- Riggs P.J., Chelius M.K., Iniguez A.L., Kaeppler S.M., Triplett E.W. (2001). Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. Aust. J. Plant Physiol. 28: 829-836.
- Rodríguez-Blanco A., Sicardi M., Frioni L. (2009). Efecto del genotipo de la planta y de la fertilización nitrogenada sobre la diversidad de diazótrofos asociados a maíz (*Zea mays* L.). XXIV Reunión Latinoamericana de Rhizobiología (RELAR) y I Conferencia Iberoamericana de Interacciones beneficiosas microorganismo-planta-ambiente (I IBEMPA), La Habana, Cuba.
- Rodríguez-Blanco A. (2011). Comunidades de diazótrofos asociados a maíz en Uruguay. Tesis de Doctorado en Biología, PEDECIBA (Programa de Ciencias Básicas) Universidad de la República. Pp 179.
- Roesch L.F.W., Olivares F.L., Passaglia L.M.P., Selbach P.A., de Sá E.L.S., de Camargo F.A.O. (2006). Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. World J. Microbiol. Biotechnol. 22: 967-974.
- Roesch L.F.W., Camargo F.A., Bento F.M., Triplett E.W. (2008). Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. Plant soil 302: 91-104.

- Rojas-Tapias D.F., Bonilla R.R., Dussan J. (2012). Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria on growth and copper uptake by sunflowers. *Water Air Soil Pollut.* 223: 643-654.
- Rosas S.B., Avanzini G., Carlier E., Pasluosta C., Pastor N., Rovera M. (2009). Root colonization and growth promotion of wheat and maize by *Pseudomonas aurantiaca* SR1. *Soil Biol. Biochem.* 41: 1802-1806.
- Rosenblueth M., Martínez-Romero E. (2004). *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. *Arch. Microbiol.* 181: 337-344.
- Rosenblueth M., Martínez-Romero E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19: 827-837.
- Rumbaugh M.D., Johnson D.A. (1991). Field acetylene reduction rates of *Lupinus argenteus* along an elevational gradient. *Great Basin Nat.* 51: 192-197.
- Saavedra C. (2011). Un siglo de agricultura. En: Revista del plan agropecuario N° 137 de marzo de 2011. MGAP-DIEA, Montevideo, Uruguay. 46-49.
- Santi C., Bogusz D., Franche C. (2013). Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Ann. Bot.* 111: 743-767.
- Scher F.M., Baker R. (1982). Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology.* 72: 1567-1573.
- Schnier H.F., Weing G., Labert F., Simon V., Schmuck R. (2003). Honey bee safety of imidacloprid corn seed treatment. En: Proceedings 8th international symposium of the ICP-BR bee protection group "Hazards of pesticides to bees". Porrini C., Bortolotti L. (Eds). Bulletin of Insectology, Bologna, Italy. 56: 73-75.
- Schütte U.M., Abdo Z., Bent S.J., Shyu C., Williams C.J., Pierson D., Forney L.J. (2008). Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 365-380.
- Seghers D., Wittebolle L., Top E.M., Verstraete W., Siciliano S.D. (2004). Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1475-1482.
- Sessitsch A., Reiter B., Pfeifer U., Wilhelm E. (2001). Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and *Actinomycetes* specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39: 23-32.

- Sessitsch A., Reiter B., Pfeifer U., Wilhelm E. (2002). Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39: 23-32.
- Singh B., Singh Y, Sekhon G.S. (1995). Fertilizer use efficiency and nitrate pollution of groundwater in developing countries. *J. Contam. Hydrol.* 20: 167-184.
- Smith C.J., Osborn A.M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67: 6-20.
- Spaepen S., Dobbelaere S., Croonenborghs A., Vanderleyden J. (2008). Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant Soil* 312: 15-23.
- Staal M., Lintel-Hekkert S.T., Harren F., Stal L. (2001). Nitrogenase activity in cyanobacteria measured by the acetylene reduction assay: a comparison between batch incubation and on-line monitoring. *Environ. Microbiol.* 3: 343-351.
- Stoorvogel J.J., Smaling E.M.A., Janssen B.H. (1993). Calculating soil nutrient balances in Africa at different scales: I. Supra-national scale. *Fert. Res.* 35: 227-235.
- Sturz A.V., Christie B.R., Nowak J. (2000). Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Crit. Rev. Plant Sci.* 19: 1-30.
- Tailor A.J., Joshi B.H. (2012). Characterization and optimization of siderophore production from *Pseudomonas fluorescens* strain isolated from surcanage rhizosphere. *J. Environ. Res. Develop.* 6: 688-694.
- Tan Z.Y, Peng G.X, Xu P.Z. (2009). Diversity and high nitrogenase activity of endophytic diazotrophs isolated from *Oryza rufipogon* Griff. *Chinese Sci. Bull.* 54: 2839-2848.
- Tandon H.L.S. (1993). Soil fertility and fertilizer use: an overview of research for increasing and sustaining soil productivity. En: Workshop on the Integration of Natural and Man-made Chemicals in Sustainable Agriculture in Asia. Tandon H.L.S. (Ed). Int. Council of Scientific Union, New Delhi. 1-32.
- Tate D.F. (1994). Determination of nitrogen in fertilizer by combustion: Collaborative study. *J. AOAC Int.* 77: 829-839.
- Thies J.E. (2007). Soil microbial community analysis using terminal restriction fragment length polymorphisms. *Soil Sci. Soc. Am.* 71: 579-591.

- Utsumi R., Yagi T., Katayama S., Katsuragi K., Tachibana K., Toyoda H., Ouchi S., Obata K., Shibano Y., Noda M. (1991). Molecular cloning and characterization of the fusaric acid-resistance gene from *Pseudomonas cepacia*. *Agric. Biol. Chem.* 55: 1913-1918.
- Van Elsas J.D., Van Overbeek L.S. (1993). Bacterial responses to soil stimuli, En: Starvation in bacteria. Kjelleberg S. (Ed.). Plenum Press, New York, USA. 55-79.
- Van Peer R., Niemann G.J., Schippers B. (1991). Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology* 81: 728-734.
- Vargas L., de Carvalho T.L.G., Ferreira P.C.G., Baldani V.L.D., Baldani J.I., Hemery A.S. (2012). Early responses of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings to inoculation with beneficial diazotrophic bacteria are dependent on plant and bacterial genotypes. *Plant Soil* 356: 127-137.
- Verma S.C., Ladha J.K., Tripathi A.K. (2001). Evaluation of plant growth promotion and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J. Biotechnol.* 91: 127-141.
- Verma S.C., Singh A., Chowdhury S.P., Tripathi A.K. (2004). Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp. using green fluorescent protein reporter. *Biotechnol. Lett.* 26: 425-429.
- Vermeiren H., A. Willems, G. Schoofs, R. de Mot, V. Keijers, W. Hai, and J. Vanderleyden. (1999). The rice inoculant strain *Alcaligenes faecalis* A15 is a nitrogen-fixing *Pseudomonas stutzeri*. *System. Appl. Microbiol.* 22: 215-224.
- Vessey J.K. (1994). Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: in defense of the acetylene reduction assay. *Plant Soil* 158: 151-162.
- Vessey K.J. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255: 571-586.
- Voelcker J.A. (1896). Nitragin or the use of pure cultivation bacteria for leguminous crops. *J. Royal Agr. Soc.* 7: 253-264.
- Von der Weid I., Duarte G.F., Van Elsas J.D., Seldin L. (2002). *Paenibacillus brasilensis* sp. nov., a novel nitrogen-fixing species isolated from the maize rhizosphere in Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 2147-2153.
- Von Wintzingerode F., Gobel U.B., Stackebrandt E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 21: 213-229.

- Wagner A., Blackstone N., Cartwright P., Dick M., Misof B., Snow P., Wagner G.P., Bartels J., Murtha M., Pendleton J. (1994). Surveys of gene families using polymerase chain-reaction-PCR selection and PCR drift. *Syst. Biol.* 43: 250-261.
- Wallenstein M. (2004). Effects of increased nitrogen deposition on forest soil nitrogen cycling and microbial community structure. Ph.D. thesis, Duke University, Durham, N.C., USA.
- Watanabe I., Cholitkul W. (1979). Field studies on nitrogen fixation in paddy soils. En: *Nitrogen and Rice*. International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines. 223-239.
- Weller D.M. (1988). Biological control of soilborne plant pathogen in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathology.* 26: 379-407.
- Wiedenhoeft A.C. (2009). *Plant Nutrition*. Chelsea House.
- Witty J.F., Minchin F.R. (1988). Measurement of nitrogen fixation by the acetylene reduction assay; myths and mysteries. En: *Nitrogen fixation by legumes in Mediterranean Agriculture*. Beck D.P., Materon L.A. (Eds). Springer, Netherlands. 331-344.
- Wolk C.P. (1996). Heterocyst formation. *Annu. Rev. Genet.* 30: 59-78.
- Xie H., Pasternak J.J., Glick B.R. (1996). Isolation and characterization of mutants of plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2. that over produce indole acetic acid. *Curr. Microbiol.* 32: 67-71.
- Yang Z.Y., Dean D.R., Seefeldt L.C. (2011). Molybdenum nitrogenase catalyzes the reduction and coupling of CO to form hydrocarbons. *J. Biol. Chem.* 286: 19417-19421.
- Yasin M., Ahmad K., Mussarat W., Tanveer A. (2012). Bio-fertilizers, substitution of synthetic fertilizers in cereals for leveraging agriculture. *Crop Environ.* 3: 62-66.
- Yeager C.M., Kornosky J.L., Housman D.C., Grote E.E., Belnap J., Kuske C.R. (2004). Diazotrophic community structure and function in two successional stages of biological soil crusts from the Colorado Plateau and Chihuahuan Desert. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 973-983.
- Yim W.J., Poonguzhali S., Madhaiyan M., Palaniappan P., Siddikee M.A., Sa T. (2009). Characterization of plant-growth promoting diazotrophic bacteria isolated from field-grown Chinese cabbage under different fertilization conditions. *J. Microbiol.* 47: 147-155.

- Young J.P.W. (1992). Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. En: Biological Nitrogen Fixation. Stacey G., Burris R.H., Evans H.J. (Eds.). Chapman and Hall, New York, USA. 43-86.
- Zdor R.E., Anderson A.J. (1992). Influence of root colonizing bacteria on the defense responses of bean. *Plant Soil* 140: 99-107.
- Zehr J.P., Jenkins B.D., Short S.M., Steward G.F. (2003). Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ. Microbiol.* 5: 539-554.
- Zhang L., Hurek T., Reinhold-Hurek B. (2007). A *nifH*-based oligonucleotide microarray for functional diagnostics of nitrogen-fixing microorganisms. *Microbiol. Ecol.* 53: 456-470.
- Zhang J., Zeng G., Chen Y., Yu M., Yu Z., Li H., Yu Y., Huang H. (2011). Effects of physico-chemical parameters on the bacterial and fungal communities during agricultural waste composting. *Bioresour. Technol.* 102: 2950-2956.
- Zhao D., Li J. (2004). Construction and characterization of double mutants in nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*. *Chin. Sci. Bull.* 49: 1707-1713.