



Tesis de Maestría en Biotecnología

Facultad de Ciencias,

Evaluación de bacterias pertenecientes a colecciones nacionales por su capacidad de actuar sobre la fitodisponibilidad del fósforo: selección, mecanismos involucrados y potencial uso como biofertilizantes en plantas de Soja (*Glycine max*).

María Victoria Cerecetto González

2018

Orientadora: Elena Beyhaut

Co-orientadora y Directora

Académica: Ana Fernández

Tribunal: Carolina Leoni

Andrea Rodríguez

Gilberto Tardone

Dedicado a mi Mamá

Este trabajo fue realizado en:

Laboratorio de Microbiología de Suelos

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA)-Las Brujas

Rincón del Colorado, Canelones, Uruguay.

y durante una pasantía en:

Unidad Mixta de Investigación Ecologie Fonctionnelle & Biogéochimie des Sols & des Agroecosystemes

CIRAD, INRA, IRD, SupAgro

Montpellier, Francia.

Financiado por:

ANII (Beca de posgrado y de movilidad)

INIA

Maestría en Biotecnología

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todos aquellos que me han acompañado en el transcurso de estos años e hicieron posible la realización de esta tesis. No han sido pocos y he tenido la suerte de contar con su precesencia en los momentos difíciles.

Comenzando por Elena, por haberme dado la oportunidad de realizar esta Maestría, brindarme sus conocimientos, formarme y apoyarme en los momentos más difíciles (especialmente en esta última etapa). Agradecer también a Ana Fernández por participar como co-orientadora y directora académica.

Gracias a mis compañeros de los laboratorios de Microbiología de Suelos y de Bioproducción, INIA-Las Brujas, los que están y los que ya no, por los momentos compartidos. Especialmente a Nadia, Mariana, Sebastián y Natalia Mattos por ayudarme con algún repique, algún riego de plantas o conteo de nódulos, y que junto con Natalia Scopise, me hicieron más divertidos los madrugones, gracias por la amistad.

Gracias a Silvia por apoyarme con la idea de presentar un proyecto María Viñas y por presentarlo, y por ayudarme en otras cuestiones bioinformáticas. Agradecer a Nora por apoyar y guiar en numerosas instancias.

Gracias a mis compañeros de l'UMR Eco&Sols, que me hicieron sentir muy bienvenida. A Carlos, por ayudarme en la Serre, por prestarme vajilla, ventilador, etc y estar siempre dispuesto a ayudar con los problemas que me iban surgiendo, por recibirme en su casa, llevarnos de paseo y por enseñarme un poquito de catalán y un poquito de idioma Carlos. A Laurie, por enseñarme la técnica de RT-PCR *in situ*, y siempre ser tan amable y atenta conmigo, por sus llamadas en su intento de español y por las soirées en su casa. A Luis, cubano querido, mi compa latino. A Merche, por haberme recibido en su casa durante varios días, por esas idas a la playa, los domingos de randonné, por ser una amiga además de compañera. A Jaque y Geisi por enseñarme a falar portuñol, por esos viajes juntas, por su cariño, por su amistad y por haberme cocinado tantas cosas ricas. A Philippe D. por tenerme paciencia con mi francés, escucharme y hacerme hablar y practicar. A Najat y Saluo por su amistad y por esos maravillosos tés. A Jean Jacques por recibirme en su laboratorio, guiarme y compartir sus conocimientos, sin él no habría sido posible esta pasantía. A Mustapha que fue todo durante esos siete meses, profe de francés, traductor, amigo, compañero de laboratorio, de mates, de tés, de viajes, de vida.

Gracias al INIA y a l'UMR Eco&Sols por dejarme utilizar sus instalaciones y materiales para desempeñar este trabajo. Al INIA y la Maestría en Biotecnología por financiarme idas a congresos. Agradecer a la ANII por otorgarme las becas de posgrado y de movilidad.

Gracias a los miembros del tribunal, Carolina Leoni, Andrea Rodríguez y Silvana Tarlera, por evaluar esta tesis.

Gracias a mis amigos de la facu, a pesar de que algunos estén a miles de kilómetros de distancia, ellos siempre están. Especialmente a Flor, por haberme acompañado en este camino desde el primer día del curso introductorio, y por seguir trabajando juntas. Gracias a mis amigos de la vida por su apoyo incondicional durante todos estos años.

Gracias a mi familia, abuelos, tías y primos. Especialmente a mis hermanos, a mi papá, y muy especialmente a mi mamá, sin ella no sería la mujer que soy hoy en día, gracias por tu apoyo y consejos, por enseñarme a ser una mujer independiente, que se anima a vivir de lo que le gusta, por animarme a cumplir mis sueños, vivir en otros países, conocer otras culturas y a estar en continuo aprendizaje, gracias por ser vos una mujer libre, luchadora y siempre con ganas de aprender, de hacer más, de tirar para adelante, y por criarme así, gracias por todo lo que luchaste estos últimos años, por estar conmigo en los momentos en que más te necesitaba, aunque hubiera miles de kilómetros de distancia o aunque vos estuvieras mal. Se que siempre estas conmigo. Te amo infinitamente.

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|--|-----|
| TABLA DE CONTENIDOS..... | I |
| ÍNDICE DE ABREVIATURAS..... | IV |
| RESUMEN..... | VII |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 2 |
| 1.1. EL FÓSFORO EN EL SUELO..... | 2 |
| 1.2. ABSORCIÓN DEL FÓSFORO POR LAS PLANTAS..... | 8 |
| 1.3. MOVILIZACIÓN DEL FÓSFORO INORGÁNICO EN LA RIZÓSFERA..... | 9 |
| 1.3.1. Cambios de pH inducidos por las plantas..... | 9 |
| 1.3.2. Cambios de pH inducidos por los microorganismos..... | 9 |
| 1.4. MOVILIZACIÓN DEL FÓSFORO ORGÁNICO EN LA RIZÓSFERA..... | 10 |
| 1.4.1. Fitasas..... | 13 |
| 1.5. RECICLAJE DEL FÓSFORO MICROBIANO EN LA RIZÓSFERA..... | 14 |
| 1.6. BACTERIAS SOLUBILIZADORAS Y/O MINERALIZADORAS DE FÓSFORO COMO PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL..... | 15 |
| 1.7. EL CULTIVO DE SOJA..... | 19 |
| 1.7.1. Importancia en Uruguay..... | 19 |
| 1.7.2. Fijación biológica del nitrógeno..... | 19 |
| 1.7.3. El fósforo en la fijación biológica del nitrógeno..... | 20 |
| 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS..... | 23 |
| 2.1. HIPÓTESIS..... | 23 |
| 2.2. OBJETIVOS..... | 23 |
| 2.2.1. Objetivo general..... | 23 |
| 2.2.2. Objetivos específicos..... | 23 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 25 |
| 3.1. GERMOPLASMA BACTERIANO..... | 25 |
| 3.2. CAPACIDAD DE SOLUBILIZACIÓN Y/O MINERALIZACIÓN DE FÓSFORO <i>in vitro</i> | 26 |
| 3.2.1. Solubilización y/o mineralización de fósforo en medio sólido..... | 26 |
| 3.2.2. Mineralización de fósforo en medio líquido..... | 28 |

| | |
|--|----|
| 3.3. ENSAYOS DE COMPATIBILIDAD..... | 29 |
| 3.3.1. Ensayo de compatibilidad <i>in vitro</i> | 29 |
| 3.3.2. Ensayo de compatibilidad <i>in vivo</i> | 30 |
| 3.4. ENSAYO DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL Y DE ABSORCIÓN DE FÓSFORO..... | 33 |
| 3.5. FITASAS RIZOBIANAS EN LA SIMBIOSIS SOJA- <i>Bradyrhizobium elkanii</i> | 34 |
| 3.5.1. Mineralización de fósforo en medio líquido por <i>Bradyrhizobium elkanii</i> U1301 y U1302..... | 35 |
| 3.5.2. RT-PCR <i>in vitro</i> de fitasas rizobianas..... | 36 |
| 3.5.3. Cultivo hidroaeropónico de soja- <i>Bradyrhizobium elkanii</i> U1301 o U1302..... | 39 |
| 3.5.4. Fijación, inclusión en parafina y corte histológico de nódulos de soja...41 | |
| 3.5.5. RT-PCR <i>in situ</i> de transcriptos HAP rizobianos en nódulos de soja..... | 43 |
| 3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS..... | 46 |
| 4. RESULTADOS..... | 48 |
| 4.1. CAPACIDAD DE SOLUBILIZACIÓN Y/O MINERALIZACIÓN DE FÓSFORO <i>in vitro</i> | 48 |
| 4.1.1. Solubilización y/o mineralización de fósforo en medio sólido..... | 48 |
| 4.1.2. Mineralización de fósforo en medio líquido..... | 52 |
| 4.2. ENSAYOS DE COMPATIBILIDAD..... | 56 |
| 4.2.1. Ensayo de compatibilidad <i>in vitro</i> | 56 |
| 4.2.2. Ensayo de compatibilidad <i>in vivo</i> | 57 |
| 4.3. ENSAYO DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL Y DE ABSORCIÓN DE FÓSFORO..... | 60 |
| 4.4. FITASAS RIZOBIANAS EN LA SIMBIOSIS SOJA- <i>Bradyrhizobium elkanii</i> | 63 |
| 4.4.1. Mineralización de fósforo en medio líquido por <i>Bradyrhizobium elkanii</i> U1301 y U1302..... | 64 |
| 4.4.2. RT-PCR <i>in vitro</i> de fitasas rizobianas..... | 65 |
| 4.4.3. Cultivo hidroaeropónico de soja- <i>Bradyrhizobium elkanii</i> U1301 o U1302..... | 67 |
| 4.4.4. RT-PCR <i>in situ</i> de transcriptos HAP rizobianos en nódulos de soja..... | 70 |
| 5. DISCUSIÓN..... | 74 |
| 5.1. CAPACIDAD DE SOLUBILIZACIÓN Y/O MINERALIZACIÓN DE FÓSFORO <i>in vitro</i> | 74 |

| | |
|--|-----|
| 5.2. EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE CEPAS MINERALIZADORAS DE FITATO EN LA SIMBIOSIS SOJA-RIZOBIO..... | 77 |
| 5.3. FITASAS RIZOBIANAS EN LA SIMBIOSIS SOJA- <i>Bradyrhizobium elkanii</i> | 81 |
| 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS..... | 85 |
| ANEXO I-Resumen de microorganismos mineralizadores de fitato y promotores del crecimiento vegetal..... | 88 |
| ANEXO II-Cepas de rizobios, <i>Streptomyces</i> y <i>Bacillus</i> evaluadas en esta tesis..... | 89 |
| ANEXO III-Medios de cultivo y soluciones..... | 92 |
| ANEXO IV-Análisis de la varianza de todas las variables determinadas..... | 101 |
| ANEXO V-RT y NRT-PCR <i>in situ</i> de transcritos HAP rizobianos en nódulos de soja..... | 121 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 123 |

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|---|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADNc | Ácido desoxirribonucleico complementario |
| ADNg | Ácido desoxirribonucleico genómico |
| ANII | Agencia Nacional de Investigación e Innovación |
| ANOVA | Análisis de varianza |
| AP-antiDIG | Anticuerpo anti-Digoxigenina conjugado con una fosfatasa alcalina |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| BMF | Bacterias mineralizadoras de fitato |
| BPP | Beta-propeller fitasa |
| BSA | Albúmina de suero bovino |
| BSF | Bacterias solubilizadoras de fosfato |
| CM | Cuadrado medio |
| CPhy | Cisteín fitasa |
| c.s.p. | Cantidad suficiente para |
| DE | Desvío estándar |
| Dig-11-Dutp | Digoxigenina-11-uridina trifosfato |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| dNTPs | Desoxinucleótidos |
| DO | Densidad óptica |
| ELF | Filtro Hoechst |
| FBN | Fijación biológica de nitrógeno |
| GI | Grados de libertad |
| GTP | Guanosín trifosfato |
| H ₂ O _d | Agua destilada |
| H ₂ O DEPC | Agua ultra pura del tipo miliQ estéril tratada con di-etilpirocarbonato |
| HAP | Histidina ácida fosfatasa |
| HSF | Hongos solubilizadores de fosfato |

| | |
|---------------------|---|
| M1 | Morfotipo 1 |
| M2 | Morfotipo 2 |
| M3 | Morfotipo 3 |
| MGAP | Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca |
| MPM | Marcador de peso molecular |
| MSF | Microorganismos solubilizadores de fosfato |
| N5909 | Nidera 5909 |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato |
| NCBI | <i>National Center of Biotechnology Information</i> |
| NRT | No retrotranscripción-PCR <i>in situ</i> |
| PAP | Púrpura ácida fosfatasa |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| Pdef | Fósforo deficiente |
| PGPR | Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal |
| Pi | Fósforo inorgánico |
| Po | Fósforo orgánico |
| Psuf | Fósforo suficiente |
| RC | Rojo Congo |
| RT | Retrotranscripciones |
| SC | Suma de cuadrados |
| SR532 | Santa Rosa 532 |
| TA | Temperatura ambiente |
| TD-PCR | <i>Touchdown</i> PCR |
| TSA | Medio de cultivo Agar de Soja Tréptico |
| TSB | Caldo de cultivo de Soja Tréptico |
| TY | Medio de cultivo Triptona Extracto de Levadura |
| UMR Eco&Sols des | Unidad Mixta de Investigación Ecologie Fonctionnelle & Biogéochimie des Sols & des Agroecosystemes |

| | |
|-----|--|
| YD | Medio de cultivo Extracto de Levadura Dextrosa |
| YEM | Medio de cultivo Extracto de Levadura Manitol |

RESUMEN

El fósforo (P) es el segundo macronutriente limitante en la producción agrícola a nivel mundial. La concentración de P en la solución del suelo generalmente es baja. Los microorganismos del suelo tienen un rol principal en el ciclo biogeoquímico del P. Los principales dos objetivos de este trabajo fueron: 1) seleccionar y evaluar cepas bacterianas de rizobios, *Streptomyces* y *Bacillus* capaces de solubilizar y/o mineralizar distintas fuentes de P y de aumentar la absorción de P en plantas de soja (*Glycine max*); 2) estudiar un mecanismo de interacción soja-rizobio implicado en la adquisición y reciclaje de P en la planta, y su contribución en la adaptación de la simbiosis a la deficiencia de P. Las cepas fueron evaluadas en medio sólido suplementado con diferentes fuentes de P, fitato de sodio, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 y FePO_4 . Las cepas que produjeron halo en el medio sólido suplementado con fitato, fueron evaluadas en medio líquido, con el fin de cuantificar su actividad mineralizadora. Ninguna cepa fue capaz de solubilizar AlPO_4 o FePO_4 . Sin embargo, 45% de los rizobios, 33% de los *Streptomyces* y 50% de los *Bacillus* fueron capaces de solubilizar $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. A su vez, 20% de los rizobios, 28% de los *Streptomyces* y 40% de los *Bacillus* fueron capaces de mineralizar fitato de sodio. Se co-inocularon las cepas que presentaron una mayor actividad mineralizadora y el inoculante comercial, conformado por las cepas *Bradyrhizobium elkanii* U1301 y U1302, en plantas de soja, cultivadas en fitato de sodio. La cepa *B. megaterium* ILBB 592 aumentó significativamente el P acumulado en la parte aérea. Convirtiéndose en una cepa candidata para desarrollar un producto microbiano con la capacidad de aumentar la absorción de P en soja. Dos cultivares de soja, N5909 y SR532, inoculados con *B. elkanii* U1301, se cultivaron en hidroaeroponía bajo P suficiente y P deficiente, y se realizó una *in situ* RT-PCR de los transcritos rizobianos fitasa del tipo histidina ácida fosfatasa (HAP), en secciones de nódulos de cada una de estas plantas. El cultivar SR532 inoculado con U1301, expresó una mayor cantidad de transcritos HAP bajo P deficiente, demostrando que el material vegetal puede influenciar el nivel de expresión de HAP rizobianas. Este alto nivel de expresión de HAP sugiere que esta enzima rizobiana contribuye a la adaptación del cultivar SR532 en condiciones de P deficiente, sin necesidad de inocular otros microorganismos. Con este trabajo, se evaluaron diferentes aproximaciones para mejorar la absorción del P por las plantas de soja, evitando agregar P excesivo al ambiente.

Palabras clave: biofertilizantes, bacterias solubilizadoras/mineralizadoras de fósforo, rizobios, *Streptomyces*, *Bacillus*.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL FÓSFORO EN EL SUELO

El fósforo (P) es el segundo elemento limitante para el crecimiento vegetal luego del nitrógeno (N), siendo por tanto un nutriente esencial para la producción agropecuaria. La cantidad de P en las plantas va desde el 0.05 al 0.30% del peso seco total (Vance, 2001). Es considerado un macronutriente ya que los vegetales necesitan cantidades significativas de este nutriente mineral debido a que es esencial en el metabolismo vegetal. Este macronutriente constituye proteínas, ácidos nucleicos y ácidos grasos, como los fosfolípidos de las membranas biológicas. A su vez participa regulando ciertas vías metabólicas y forma parte de co-enzimas esenciales (Sharma *et al.*, 2011). Es parte de moléculas involucradas en el flujo de energía de los seres vivos como el adenosín trifosfato (ATP), guanosín trifosfato (GTP) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) (Azziz, 2010). Este macronutriente, a su vez, participa de varias actividades fisiológicas en las plantas, como la división celular, la fotosíntesis, el desarrollo del sistema radicular, es esencial para formación de flores, semillas y frutas (Sharma *et al.*, 2011).

El ciclo del P es un ciclo “abierto” o “sedimentario”, ya que no existe un intercambio entre la porción terrestre del elemento con la atmosférica (Azziz, 2010) (Figura 1). El proceso geológico comienza desde los depósitos rocosos, que con la ayuda de la erosión penetra en la biosfera, finalizando en los cuerpos de agua y sedimentos, demorando millones de años en completarse el ciclo, contrariamente a lo que sucede con los ciclos del carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O) y N, ya que los mismo son mucho más rápidos (Holtan *et al.*, 1988).

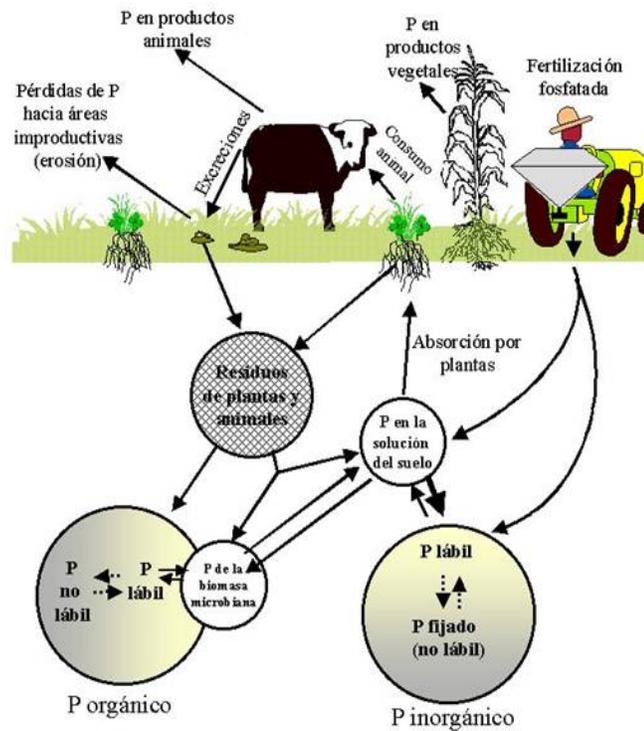


Figura 1. Reservorios y flujos del fósforo en agroecosistemas (adaptado de Chauhan *et al.*, 1981).

El P total es abundante en la mayoría de los suelos (Richardson, 2001). Estimaciones teóricas sugieren que el P acumulado en suelos agrícolas es suficiente para mantener el máximo rendimiento de los cultivos por alrededor de cien años (Goldstein *et al.*, 1993). Sin embargo, únicamente entre el 1 y 5% del P total se encuentra en formas disponibles para las plantas (Khan *et al.*, 2013). Las plantas absorben únicamente el P disuelto en la solución del suelo, que se encuentra como iones ortofosfato: HPO_4^{2-} o H_2PO_4^- (Richardson & Simpson, 2011). Incluso, en suelos considerados fértiles no se encuentran concentraciones mayores a 10 μM en forma soluble (Gyaneshwar *et al.*, 2002).

La retención del P por los suelos se debe a dos procesos químicos que ocurren en el mismo: la adsorción y la precipitación. La adsorción es una reacción que involucra la remoción del fosfato de la solución hacia la fase sólida. La misma puede ser física o química. La precipitación es la remoción de dos o más componentes debido a su mutua combinación desde la solución hacia la fase sólida, formándose así un nuevo componente de la fase sólida (Holtan *et al.*, 1988).

El P total presente en los suelos se integra por dos fracciones, la orgánica y la inorgánica. El P que integra la fracción inorgánica, se encuentra como minerales primarios, derivados de material parental, o como minerales secundarios, originados mediante adsorción o precipitación (Hinsinger *et al.*, 2015). En la fracción mineral se encuentra formando compuestos con aluminio (Al), hierro (Fe) y calcio (Ca). La proporción de cada compuesto varía entre los distintos suelos, dependiendo entre otras cosas del material madre, el pH y la temperatura (Richardson, 2001). En suelos ácidos pueden ocurrir precipitaciones del P con el Fe y Al en solución, adsorción del P en oxi-hidróxidos de Fe y Al, y adsorción del P en arcillas aluminosilicatadas. Por otro lado, en suelos alcalinos pueden ocurrir precipitaciones del P con el Ca, formando mayoritariamente apatitas, adsorción del P sobre carbonato de calcio (CaCO_3) y adsorción del P en arcillas aluminosilicatadas (Holtan *et al.*, 1988) (Tabla 1).

Tabla 1. Formas de fósforo mineral (adaptado de Tsai & Rosseto, 1992).

| | DENOMINACIÓN | COMPOSICIÓN | CARACTERÍSTICAS |
|-------------------------|--------------------|--|-------------------|
| FOSFATOS DE CALCIO | Hidroxiapatita | $3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{Ca}(\text{OH})_2$ | Mayor abundancia |
| | Oxiapatita | $3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{CaO}$ | |
| | Fluoroapatita | $3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{CaF}_2$ | Mayor abundancia |
| | Carbonoapatita | $3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{CaCO}_3$ | |
| | Fosfato Tricálcico | $3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | |
| FOSFATOS DE HIERRO | Fosfato Bicálcico | CaHPO_4 | Mayor solubilidad |
| | Vivianita | $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ | |
| FOSFATOS DE ALUMINIO | Estrengita | $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | |
| | Variscita | $\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | |

El rango de pH óptimo para la disponibilidad máxima del P es de 6.0-7.0. La solubilidad de los compuestos fosfatados-Ca, aumenta cuando disminuye el pH, mientras que con los compuestos fosfatados-Fe y -Al sucede lo contrario, su solubilidad aumenta cuando se aumenta el pH (Richardson, 2001).

El P orgánico (Po) se define como los compuestos orgánicos producidos por los organismos vivos que contienen uno o más grupos P y por lo menos un enlace covalente P-C, generalmente vía un enlace éster. El Po puede representar entre el 30% y 90% del P total en el suelo (Hinsinger *et al.*, 2015). El Po se puede encontrar incorporado a la biomasa o asociado

con la materia orgánica del suelo. La fracción orgánica de P en el suelo se encuentra compuesta por diferentes formas de fosfatos mono o di-esteres, siendo la predominante el mio-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6-hexakis dihidrogen fosfato, llamado comúnmente ácido fítico (Maougal *et al.*, 2014b), el cual puede representar hasta el 80% o más del Po total (Quiquampoix & Mousain, 2005). Sus sales (fitatos) son la principal forma de almacenamiento del P en cereales y legumbres usadas en la alimentación animal, constituyendo del 60% al 90% del contenido total de P en las plantas (Yao *et al.*, 2011). Los fitatos son muy estables y tienden a acumularse en suelos vírgenes debido a que se comportan de manera similar a los iones fosfato reaccionando con los iones presentes en el suelo y formando complejos insolubles (Alexander, 1977) (Figura 2).

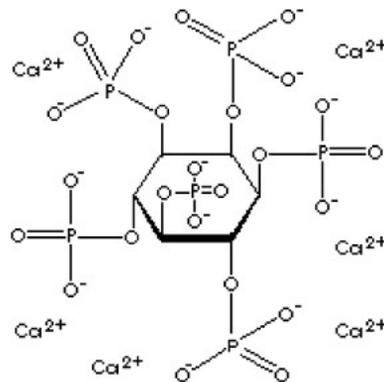


Figura 2. Ácido fítico interactuando con cationes de un metal divalente (Singh & Satyanarayana, 2011).

En Uruguay, los suelos tienen niveles de P disponible por debajo de los requerimientos de la mayoría de los cultivos y pasturas sembradas (Morón, 1996; Hernández & Zamalvide, 1998). Si bien los niveles de P total del suelo pueden ser altos, este nutriente se encuentra en formas no asimilables. En los suelos del Uruguay la fracción de Po representa en promedio el 51% del P total (Hernández *et al.*, 1995) (Tabla 2).

Tabla 2. Contenido de fósforo total y proporciones en fracciones inorgánicas y orgánicas en suelos bajo campo natural (adaptado de Hernández *et al.*, 1995).

| GEOLOGÍA | P total | P inorgánico | P orgánico/P total |
|---------------------|---------------------|--------------|--------------------|
| | mg.kg ⁻¹ | | |
| Lavas basálticas | 583 | 285 | 49 |
| Limos terciarios | 374 | 170 | 45 |
| Granitos-migmatitas | 260 | 145 | 56 |
| Areniscas triásicas | 163 | 73 | 45 |

En nuestro país, entre las formas de retención de P en la fracción mineral, la fracción de P ligada al Fe es la mayor (Hernández, 1997; Hernández & Meurer, 1998) (Tabla 3).

Tabla 3. Proporciones de grupos de compuestos fosfatados en la fracción inorgánica de distintos materiales madres en Uruguay (adaptado de Hernández *et al.*, 1995).

| GEOLOGÍA | %P-Al | %P-Fe | %P-Ca |
|---------------------|-------|-------|-------|
| Lavas basálticas | 19 | 56 | 25 |
| Limos terciarios | 37 | 36 | 27 |
| Granitos-migmatitas | 27 | 62 | 11 |
| Areniscas triásicas | 47 | 34 | 19 |

La estrategia histórica para levantar esta limitante de P en la producción agropecuaria ha sido el agregado de fertilizante fosfatado obtenido de minas de roca de fosfato (Cordell *et al.*, 2010). Pero, entre el 75-90% del fertilizante agregado precipita rápidamente en el suelo (Gyaneshwar *et al.*, 2002). Otra posible entrada de P al suelo, son los restos vegetales no consumidos, las heces y orina de los animales en sistemas de pastoreo y la fertilización con estiércoles en sistemas agrícolas (Del Pino & Hernández, 2002).

La conversión de formas insolubles de P a formas solubles de P puede ser realizada mediante dos grandes mecanismos: la solubilización y la mineralización. La solubilización es el proceso mediante el cual formas insolubles de P inorgánico (Pi) son transformadas a formas solubles de P, y la mineralización es la hidrólisis mediante el cual formas insolubles de Po liberan formas solubles de P (Hinsinger *et al.*, 2015)(Figura 3).

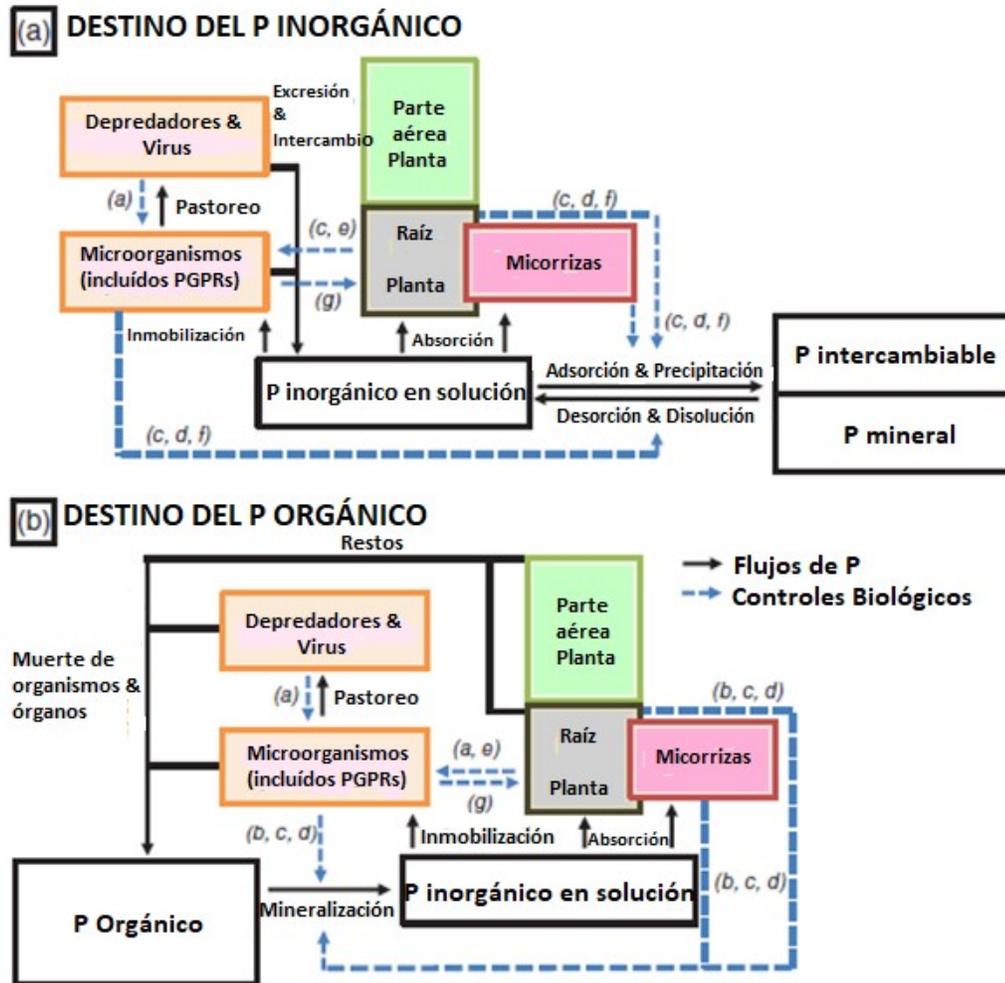


Figura 3. Procesos biológicos de control, (flechas punteadas azules) utilizados por plantas y microorganismos, que afectan los flujos de fósforo en el suelo (flechas negras rellenas) dentro del (a) subciclo de fósforo inorgánico, y (b) subciclo del fósforo orgánico. Los controles biológicos de los flujos de fósforo en el suelo, involucran: (a) la promoción y selección de microorganismos del suelo; (b) liberación de enzimas; (c) modificación del pH; (d) liberación de ácidos carboxílicos; (e) rizodeposición; (f) depleción de fósforo; y (g) efectos hormonales y de señalización. Todos estos efectos pueden actuar concurrentemente en la rizósfera (adaptado de Hinsinger *et al.*, 2015).

1.2. ABSORCIÓN DEL FÓSFORO POR LAS PLANTAS

La movilidad del P en el suelo es muy limitada y por lo tanto, las raíces pueden absorber el P solamente de su entorno inmediato. Esta absorción está dada por transportadores de alta afinidad localizados en la epidermis de raíces, los cuales son expresados cuando la planta presenta deficiencia de P y en presencia de micorrizas (Bucher, 2007). Las raíces rápidamente vacían el P en solución de su entorno inmediato (Hinsinger *et al.*, 2015).

Cuando redefinió el concepto de biodisponibilidad, Harmsen (2007) señaló la existencia de una zona de bioinfluencia alrededor de cada organismo vivo, donde las propiedades del medio y por ende los nutrientes disponibles son modificadas. Por esto, la biodisponibilidad del P en el suelo puede variar sustancialmente entre diferentes especies de plantas, dependiendo de su habilidad de movilizar el P en sus respectivas rizósferas (Hinsinger *et al.*, 2015).

La tasa de elongación de la raíz es el parámetro que más afecta a la absorción de P (Barber, 1995). Sin embargo, las plantas precisan otros mecanismos adicionales para obtener P bajo condiciones deficientes de P. La arquitectura radicular presenta una alta plasticidad, como respuesta a la disponibilidad del P (Hinsinger *et al.*, 2015). Los pelos radiculares, una extensión de las células epidérmicas, se encuentran en la mayoría de las especies vegetales y contribuyen al aumento de la absorción del P (Brown *et al.*, 2013).

Las hifas de las micorrizas, tanto las arbusculares como las ectomicorrizas, realizan una contribución sustancial al aumento del volumen rizosférico, permitiendo que las plantas tengan un mayor acceso a nutrientes poco móviles, como el P (Hinsinger *et al.*, 2011). Mientras que la longitud de los pelos radiculares es de 1 mm, las hifas de las micorrizas arbusculares pueden extenderse varios centímetros desde la superficie radicular (Jakobsen *et al.*, 1992). A su vez, su pequeño diámetro permite a las micorrizas penetrar en pequeños poros del suelo, inaccesibles para las raíces o los pelos radiculares (Hinsinger *et al.*, 2015).

1.3. MOVILIZACIÓN DEL FÓSFORO INORGÁNICO EN LA RIZÓSFERA

La movilización del P en la rizósfera es debido a cambios en el pH inducidos tanto por las raíces como por sus microorganismos asociados, mediante el flujo de protones (H^+) y el exudado de carboxilatos por parte de ambos (Hinsinger *et al.*, 2011).

1.3.1. Cambios de pH inducidos por las plantas

Las raíces pueden aumentar o disminuir el pH en su rizósfera entre 2 y 3 unidades, mediante un eflujo o influjo de H^+ para compensar un exceso positivo o negativo de cargas entre las membranas celulares de la raíz (Hinsinger *et al.*, 2003). La acidificación de la rizósfera ocurre cuando las raíces absorben una mayor cantidad de cationes que de aniones. Esta capacidad de aumentar o disminuir el pH en la rizósfera depende de la especie vegetal, existiendo especies acidificadoras y especies alcalinizadoras (Hinsinger *et al.*, 2015).

Las raíces también son capaces de liberar carboxilatos a la rizósfera (Lambers *et al.*, 2013). Estos carboxilatos y sus correspondientes ácidos carboxílicos, también llamados ácidos orgánicos de bajo peso molecular, son de gran importancia para la movilización del P en el suelo, mediante intercambios de ligandos en sitios de P adsorbido (Hinsinger *et al.*, 2015), intercambiando aniones PO_4^{2-} por aniones ácidos (Gyaneshwar *et al.*, 2002); y quelando metales como Ca, Al o Fe involucrados en la adsorción del P. Esta liberación de ácidos orgánicos generalmente está acompañada de liberación de H^+ y otros cationes, dando lugar a la acidificación de la rizósfera (Hinsinger *et al.*, 2015). El tipo de ácido orgánico y la tasa de exudación dependen de la especie vegetal (Lambers *et al.*, 2013).

1.3.2. Cambios de pH inducidos por los microorganismos

La implicación de los microorganismos en la solubilización de fosfatos inorgánicos es conocida desde 1903 (Kucey *et al.*, 1989). La actividad microbiana es otra causante de los cambios de pH a nivel rizosférico. Los microorganismos también son capaces de producir ácidos orgánicos (Richardson & Simpson, 2011) y de aumentar o disminuir el pH en la rizósfera, mediante un eflujo o influjo de H^+ (Khan *et al.*, 2013). La producción de ácidos orgánicos constituye la principal vía para la solubilización del P de origen inorgánico en bacterias (Richardson & Simpson, 2011). Los microorganismos solubilizadores de fosfato (MSF) excretan estos ácidos orgánicos, dentro de los cuales se encuentran los ácidos: acético, láctico, oxálico,

succínico, cítrico, glucónico, cetoglucónico, glicónico, málico, fumárico, tartárico, etc (Gyaneshwar *et al.*, 2002).

Los MSF son ubicuos y su número varía de acuerdo al suelo. En el suelo, las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) constituyen entre el 1-50% y los hongos solubilizadores de fosfatos (HSF) entre 0,1-0,5% de la población total de cada suelo. En general, las BSF superan en número a los HSF en 2-150 veces (Gyaneshwar *et al.*, 2002).

A nivel internacional se ha reportado que un número sustancial de microorganismos presentan la capacidad de solubilizar P, como por ejemplo los géneros bacterianos *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Chryseobacterium*, *Gordonia*, *Phyllobacterium*, *Delftia*, *Azotobacter*, *Xanthomonas*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Rhizobium*, *Streptomyces* (Hui *et al.*, 2011; Xiang *et al.*, 2011; Ahemad & Khan, 2010; Khan *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2007; Perveen *et al.*, 2002), o los géneros de hongos filamentosos *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma* (Khan *et al.*, 2007), también se han encontrado levaduras, cianobacterias y micorrizas arbusculares capaces de solubilizar P (Sharma *et al.*, 2013). La capacidad de solubilizar P de los actinomicetes ha despertado interés en los últimos años, ya que son capaces de sobrevivir en ambientes extremos y, a su vez, presentan otros beneficios potenciales para las plantas, como la producción de antibióticos y de fitohormonas (Sharma *et al.*, 2013).

En Uruguay se han aislado, a partir de suelos agrícolas, maíz (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*) y caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), bacterias solubilizadoras de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Rhanella*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Ralstonia*, *Brevibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Herbaspirillum*, *Brevundimonas*, *Rhizobium* y *Chryseobacterium*. Sin embargo, su capacidad solubilizadora solo fue ensayada *in vitro* (Azziz *et al.*, 2012; Montañez *et al.*, 2012; Taulé *et al.*, 2012; Mareque *et al.*, 2015).

1.4. MOVILIZACIÓN DEL FÓSFORO ORGÁNICO EN LA RIZÓSFERA

La degradación de los compuestos orgánicos que contienen P depende de los factores ambientales y de las propiedades fisicoquímicas y bioquímicas de sus moléculas; por ejemplo, ácidos nucleicos, fosfolípidos y fosfatos de azúcar se descomponen fácilmente, pero el ácido

fítico, polifosfatos y fosfonatos se descomponen más lentamente (Karpagam & Nagalakshmi, 2014).

El P puede ser liberado a partir de compuestos orgánicos en el suelo por tres grupos de enzimas: 1) fosfatasas no específicas, que realizan la desfosforilación de enlaces fosfo-éster o fosfoanhídrido en la materia orgánica; 2) fitasas, que causan específicamente la liberación del P del ácido fítico (Figura 4); 3) fosfonatasas y C-P liasas, enzimas que realizan la división entre el carbono y el P en los organofosfonatos (Richardson *et al.*, 2005).

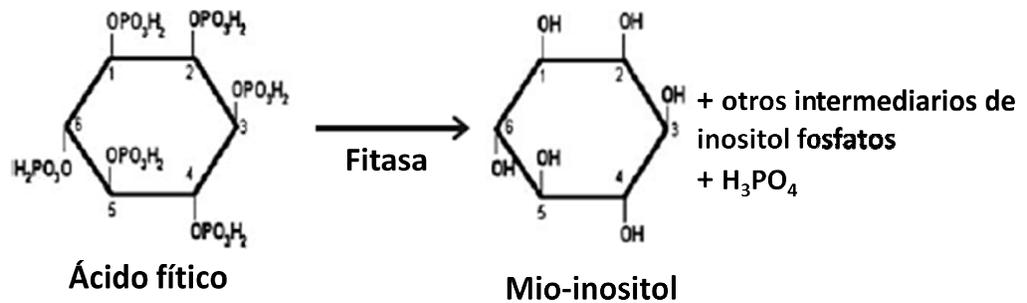


Figura 4. Reacción catalizada por la fitasa sobre el ácido fítico (adaptado de Singh & Satyanarayana, 2011).

Fosfodiésteres, como ácidos nucleicos y fosfolípidos, deben ser primero hidrolizados por nucleasas o fosfodiesterasas, con el fin de liberar los fosfomonoésteres que servirán como sustrato a las enzimas fosfatasas que finalmente liberarán el P (Hinsinger *et al.*, 2015).

Las fosfatasas liberadas al suelo, pueden ser de origen animal, vegetal o microbiano (Richardson & Simpson, 2011). Pueden ser introducidas al suelo mediante exudación activa o lisis celular (Tadano *et al.*, 1993), y estas enzimas pueden actuar unidas a la pared celular o extracelularmente (Jones & Oburger, 2011). Pueden encontrarse adsorbidas a la fase sólida del suelo, particularmente en arcillas, por lo que sus propiedades catalíticas pueden modificarse (Quiquampoix & Mousain, 2005). Conocer las propiedades fisicoquímicas que afectan la movilidad y estabilidad de estas de enzimas es de gran importancia para evaluar su efectividad en la mineralización del P (Jorquera *et al.*, 2008b). Varios ejemplos muestran que las fosfatasas microbianas son predominantes en el suelo (Plante, 2007), en comparación con las fosfatasas de origen vegetal y animal, y que estas presentan una mayor eficiencia al liberar P (Tarafdar *et al.*, 2001).

Se pueden encontrar diferentes tipos de fosfatasas, dentro de las cuales están las fosfomonoestereasas, fosfodiestereasa, trifosfórico monoéster hidrolasas y enzimas que actúan sobre los anhídridos que contienen fosfórilos y sobre enlaces P-N (Nannipieri *et al.*, 2011). Las fosfomonoestereasas, incluidas las fitasas, son las enzimas que han sido mayormente estudiadas (Jones & Oburger, 2011). Estas fosfatasas, generalmente se encuentran subdivididas de acuerdo a su pH óptimo. Mientras los microorganismos pueden producir ambos tipos de fosfatasas, ácidas o alcalinas, las plantas solo pueden producir fosfatasas ácidas (Nannipieri *et al.*, 2011). La principal actividad fosfatasa en el suelo aparentemente corresponde a la labor de las fitasas y fosfatasas ácidas, debido a la presencia predominante de sus sustratos en el suelo (Richardson, 2001). El aumento de la actividad fosfatasa ocurre en respuesta a la deficiencia de P (Richardson *et al.*, 2005). La aplicación de Pi puede reprimir la síntesis de monofosfoestereasas en el suelo (Nannipieri *et al.*, 2011). Spohn y colaboradores (2013), utilizando diluciones isotópicas de ^{33}P , sugirieron que la liberación de exudados radiculares por parte de las plantas es estratégica para aumentar la mineralización microbiana de Po, por ende para aumentar la fitodisponibilidad del P en el suelo. Se han encontrado cepas capaces de expresar un alto nivel de fosfatasas, las cuales pertenecen a los géneros *Pseudomonas* (Richardson *et al.*, 2001; Ryu *et al.*, 2005), *Bacillus* (Skrary & Cameron, 1998), *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Klebsiella* (Thaller *et al.*, 1995), *Rhizobium* (Abd-Alla, 1994), entre otros.

Las bacterias mineralizadoras de fitato (BMF) han sido aisladas de diferentes ambientes acuáticos y terrestres, tanto en humedales, praderas, suelos forestales y suelos cultivables, en estos últimos, especialmente de la rizósfera (Richardson & Hadobas, 1997). En particular, la presencia de fitasas ha sido detectada en una amplia variedad de bacterias. Jorquera *et al.* (2008b) al realizar una búsqueda de secuencias proteicas bacterianas de tipo fitasas en las bases de datos como el NCBI (siglas en inglés para *National Center of Biotechnology Information*) y *SwissProt*, hallaron que los siguientes géneros bacterianos presentaban estas enzimas: *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces* y diferentes cianobacterias, entre otras. Las BMF aisladas de la rizósfera de diferentes plantas pertenecen a los siguientes géneros: *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Klebsiella*, entre otros (Maougal *et al.*, 2014b; Ramesh *et al.*, 2014; Jorquera *et al.*, 2008a; Hill *et al.*, 2007; Richardson, 2001; Richardson & Hadobas, 1997; Yoon *et al.*, 1996). También se han aislado de diferentes suelos

hongos capaces de mineralizar el fitato, pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Emmericella* y *Penicillium* (Yadav & Tarfdar, 2003).

1.4.1. Fitasas

La denominación fitasa abarca distintos grupos de enzimas con estructuras y mecanismos catalíticos diferentes (Mullaney & Ullah, 2003). Las fitasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, las hay de origen vegetal, animal y microbiano. Las fitasas se han clasificado como 3-fitasas (EC 3.1.3.8), 6-fitasas (EC 3.1.3.26) y 5-fitasas (EC 3.1.3.72), de acuerdo a la posición en el fitato en la que ocurre la primer hidrólisis. A su vez, se pueden clasificar de acuerdo a su pH óptimo, como fitasas ácidas o alcalinas (Jorquera *et al.*, 2008b). Existe una tercer clasificación de las mismas, que depende de su mecanismo hidrolítico, la especificidad de sustrato, estructura proteica y su pH óptimo: histidina ácida fosfatasa (HAP, siglas en inglés para *histidine acid phosphatase*) (EC 3.1.3.8), beta-propeller fitasa (BPP, siglas en inglés para *beta-propeller phytase*) (EC 3.1.3.8), cisteín fitasa (CPhy, siglas en inglés para *cystein phytase*) y la púrpura ácida fosfatasa (PAP, siglas en inglés para *purple acid phosphatase*) (EC 3.1.3.2) (Mullaney & Ullah, 2003; Jorquera *et al.*, 2008b).

Las HAPs comprenden dos subclases, PhyA y PhyB, se encuentran presentes en hongos filamentosos, levaduras, bacterias y plantas, han sido ampliamente caracterizadas en hongos saprofitos como *Aspergillus niger*. Wyss *et al.* (1999) determinaron que la PhyA presenta una alta actividad específica a pH 5, su pH óptimo es 5,5, mientras que el pH óptimo de PhyB es 2,5, pH muy inferior a los encontrados en los suelos ácidos comunes. Las fitasas tipo HAPs puede romper hasta cinco grupos fosfato en fitatos libres de metales (Mullaney & Ullah, 2003; Oh *et al.*, 2004), u otros fosfomonoesteres (Wyss *et al.*, 1999).

Las BPPs son fitasas bacterianas. Estas enzimas tienen una estrecha especificidad por el fitato y requieren Ca durante la actividad catalítica, su pH óptimo se encuentra entre 7 y 8. Pueden romper hasta tres grupos fosfato en fitatos unidos a metales, como el fitato de Ca (Oh *et al.*, 2004).

Las CPhys presentan un motivo cisteína y pueden romper hasta cinco grupos fosfato en fitatos y su pH óptimo se encuentra entre 4 y 5,5 (Mullaney & Ullah, 2007).

Las PAPs presentan una actividad dual, son fosfomonoesterasas y peroxidasas (Schenk *et al.*, 2013). Son consideradas como fitasas vegetales, sus genes han sido identificados en *G. max*, *Medicago truncatula* y *A. thaliana* (Mullaney & Ulla, 2003).

Las fitasas vegetales presentan una baja actividad en raíces y otros órganos vegetales (Idriss *et al.*, 2002). Es por ello que se estima que la mayoría de las enzimas fitasas en suelo son de origen microbiano, las que parecen tener un rol clave en el ciclo del P en el mismo, y parecen ser una opción prometedora para la movilización de fitato en suelos deficientes en P (Hinsinger *et al.*, 2015).

La utilización del fitato por los microorganismos y las plantas generalmente se encuentra limitada en condiciones de campo debido a la formación de fitatos insolubles y su adsorción a las partículas del suelo. Sin embargo, la actividad fitasa puede ser estimulada mediante la aplicación de ácidos orgánicos, debido a que la secreción de los mismos, por parte de las raíces vegetales o por los microorganismos, puede aumentar la solubilización de los fitatos insolubles, quelando los cationes minerales, como el Fe^{2+} , Al^{3+} o Ca^{2+} (Singh & Satyanarayana, 2011).

1.5. RECICLAJE DEL FÓSFORO MICROBIANO EN LA RIZÓSFERA

Con fuentes de C disponibles fácilmente, los microorganismos de vida libre pueden mineralizar rápidamente el P de la materia orgánica del suelo e incorporarlo a su biomasa, y debido a que la mayoría del P microbiano se encuentra en compuestos intracelulares lábiles, el reciclaje del P microbiano es generalmente rápido. Sin embargo, este P se encontrará fitodisponible cuando las células microbianas sean lisadas por factores físicos, como estrés osmótico debido a fluctuaciones periódicas en la disponibilidad del agua, o por agentes biológicos, como fagos, protozoarios o nematodos. Estos dos últimos, pueden aumentar la adquisición de P por parte de las plantas, mediante la excreción directa de P o de material que contienen compuestos fosforados no digeridos, en la vecindad de las raíces (Hinsinger *et al.*, 2015).

1.6. BACTERIAS SOLUBILIZADORAS Y/O MINERALIZADORAS DE FÓSFORO COMO PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, siglas en inglés para *plant-growth-promoting rhizobacteria*) están ampliamente representadas en el rizomicrobioma (Hinsinger *et al.*, 2015). Kloepper y Schroth (1978) definieron a las PGPRs como un grupo de bacterias de vida libre que colonizan la rizósfera de monocotiledóneas y dicotiledóneas, y contribuyen a un aumento en el crecimiento vegetal y en el rendimiento de los cultivos.

Los microorganismos del suelo son una parte integral del ciclo del P en el suelo y por lo tanto juegan un rol importante en la disponibilidad de este elemento para las plantas. Una cantidad significativa de P es ciclada por año a través de la biomasa microbiana (100 mg P kg suelo⁻¹ año⁻¹) (Richardson & Simpson, 2011).

Algunas PGPRs pueden aumentar la fitodisponibilidad de P a través de varios mecanismos directos e indirectos, indirectamente pueden inducir procesos metabólicos en las plantas que aumenten la mineralización y solubilización del P por parte de las mismas; o directamente produciendo enzimas que mineralizan el P y ácidos orgánicos que lo solubilizan (Richardson & Simpson, 2011).

El concepto de la mejora de la fitodisponibilidad de P gracias a los microorganismos del suelo no es nuevo. En 1948, Gerretsen halló cultivos puros de bacterias del suelo capaces de incrementar la nutrición fosfatada de las plantas bajo condiciones controladas a través de la solubilización de precipitados de fosfato tricálcico (Ca₃(PO₄)₂). La identificación de cepas microbianas con capacidad de solubilizar Pi y/o hidrolizar Po constituye la base fundamental para el desarrollo de biofertilizantes (Khan *et al.*, 2013).

En años recientes, muchas publicaciones han reportado un alto número de nuevas BSF, también varias compañías de inoculantes han ofrecido al mercado productos que contienen este tipo de bacterias sin ningún registro de publicaciones. Un alto porcentaje de estos estudios son llevados a cabo solamente de manera *in vitro*, sin realizarse ensayos en planta o de aplicaciones en campo. La mayoría de estos estudios asumen que la capacidad de solubilizar *in vitro* compuestos fosfatados será traducida en una mejora de la nutrición

fosfatada en la planta *in vivo* (Bashan *et al.*, 2013). Pero existe abundante literatura donde se reporta todo lo contrario (Gyaneshwar *et al.*, 2002).

Respuestas inconsistentes a la inoculación con este tipo de microorganismos en ensayos de campo son comúnmente observadas (Khan *et al.*, 2007), esto podría deberse a varios factores como a la falta de su supervivencia y colonización de las BSF inoculadas en la rizósfera, falta de competitividad frente a los organismos nativos, la naturaleza y propiedades de los suelos y variedades vegetales, nutrientes insuficientes en la rizósfera, por ejemplo para producir la cantidad de ácidos orgánicos suficientes, la incapacidad de las BSF inoculadas de solubilizar fosfatos en el suelo (Gyaneshwar *et al.*, 2002), y a una pobre comprensión actual de los mecanismos involucrados en la promoción de crecimiento, dentro de los cuales la movilización de P no necesariamente tendría que ser el principal mecanismo (Khan *et al.*, 2007). Existe una necesidad de una mejor comprensión acerca de cómo las propiedades del suelo, los factores ambientales y las interacciones biológicas pueden influenciar la eficacia en la movilización de P (Richardson & Simpson, 2011). En resumen, independientemente de lo prometedoras que sean las BSF y la multitud de cepas aisladas y de los inoculantes microbianos en el mercado con capacidad solubilizadora de fosfato, las aplicaciones exitosas en los campos son muy bajas (Bashan *et al.*, 2013).

Por otro lado, a pesar de que las fitasas de origen microbiano juegan un rol fundamental en el ciclo del P en el suelo, las potenciales aplicaciones de las bacterias productoras de fitasas como promotoras de crecimiento vegetal han sido escasamente investigadas (Jorquera *et al.*, 2008b).

Ramesh y colaboradores (2014), estudiaron la capacidad de promover el crecimiento vegetal de tres cepas de *Bacillus aryabhatai*, aisladas de la rizósfera de soja (*Glycine max*), con actividad fitasa y capacidad de solubilizar fosfatos inorgánicos, en condiciones de microcosmo, inoculándolas en plantas de soja y trigo (*Triticum turgidum*). Al inocular con estas bacterias, se observaron mejoras en los parámetros de crecimiento vegetal y en el contenido de P, de ambos cultivos. Singh y colaboradores (2014), demostraron que los aislamientos identificados como especies de *Advenella* sp. y *Cellulosimicrobium* sp., capaces de producir sideróforos, AIA, amonio y que presentaban actividad fitasa y solubilizadora de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, al ser inoculados en plantas de mostaza de la india (*Brassica juncea*), promovían el crecimiento vegetal y aumentaban el contenido de P. Patel y colaboradores (2010), aislaron cepas de *Citrobacter*, *Pantoea*, *Klesbiella* y *Enterobacter*, capaces de promover el crecimiento de plantas de guisante

(*Cajanus cajan*), aumentando el contenido de P de la parte aérea, debido a su capacidad de exudar ácidos orgánicos y a su actividad fitasa. Singh y Satyanarayana (2010), demostraron que el hongo *Sporotrichum thermophile*, productor de una HAP extracelular, promovía el crecimiento de plántulas de trigo (*Triticum aestivum*), ya que aumentaba la biomasa y el contenido de P de las mismas. Hariprasad y Niranjana (2009), aislaron, de la rizósfera de tomate (*Solanum lycopersicum*), 14 cepas pertenecientes a diferentes géneros, como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, que al inocularlas en plántulas de tomate, promovían su crecimiento vegetal, aumentando la longitud de la parte aérea y de la raíz, el peso fresco y seco y el contenido de P, debido a que eran capaces de solubilizar fosfatos inorgánicos, mineralizar fitato, y presentaban una alta capacidad de colonizar la rizósfera y de aumentar la calidad de las semillas. Rahi y colaboradores (2009), aislaron el hongo *Discosia* sp. FIHB 571 de la rizósfera de té (*Camellia sinensis*) que mostró ser un promotor de crecimiento vegetal de maíz, arveja (*Pisum sativum*), garbanzo (*Cicer arietinum*), ya que aumentaba la longitud de la parte aérea y de las raíces, y el peso seco, debido a su capacidad de solubilizar fosfatos inorgánicos, presentar actividad fitasa, producir sideróforos y sintetizar auxinas. Yadav y Tarafdar (2007), ensayaron la capacidad de promover el crecimiento vegetal del hongo *Emericella rugulosa*, con actividad fitasa y fosfatasa, en condiciones de campo, inoculándolo en plantas de mijo perla (*Pennisetum glaucum*). La inoculación con este hongo, aumento la biomasa vegetal, la longitud de la raíz, el rendimiento y el contenido de P. Unno y colaboradores (2005), aislaron, de la rizósfera de lupín blanco (*Lupinus albus*), 300 cepas de *Burkholderia* capaces de mineralizar el fitato, las cuales fueron inoculadas en plántulas de *Lotus japonicus*, y algunos de estos aislamientos presentaron un efecto positivo en el crecimiento vegetal. Idriss y colaboradores (2002), con el fin de demostrar que la fitasa excretada por la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 era la responsable de promover el crecimiento vegetal en plantas de maíz, crecieron plántulas de maíz inoculadas con filtrados de cultivos de esta cepa en solución nutritiva que contenía fitato y luego de 15 días observaron que la misma mejoraba los parámetros de crecimiento vegetal y aumentaba el contenido de clorofila. A partir de este estudio, otros ensayos se han realizado con esta misma cepa, a modo de ejemplo, Ramírez y Kloepper (2010), han realizado ensayos de promoción de crecimiento vegetal al inocular esta cepa en plantas de col china (*Brassica rapa*), entre otros (Anexo I).

El desarrollo de biofertilizantes de base microbiana con alta producción de fitasas es de interés para la agricultura. Este tipo de inoculantes permitirá mejorar la nutrición fosfatada en los sistemas de producción, reducir los niveles de P no asimilable en el suelo, así como la

disminución del agregado de Pi a través de fertilizantes (Richardson, 2001), disminuyendo el costo económico y ambiental que conlleva utilizar este tipo de fertilizantes químicos. Desde el punto de vista económico, el P es un recurso limitado, no renovable y caro. La producción de fertilizantes químicos fosfatados es un proceso intensivo altamente demandante de energía, cuyo costo es US\$ 4 billones por año para cubrir las necesidades a nivel global (Gyaneshwar *et al.*, 2002). Según estimaciones recientes las reservas mundiales de roca fosfórica estarán agotadas en el 2050 (Vance *et al.*, 2003). La mayoría de los países de América del Sur, como Argentina, Chile, Uruguay y Brasil, importan más del 70% del P necesario para satisfacer la productividad agrícola. En particular, nuestro país es dependiente totalmente de su importación, en 2016 se importaron 31.773 toneladas de superfosfato triple, a un costo de 9.655 millones de dólares (MGAP, 2016). Sumado a la problemática agropecuaria, se debe considerar la contaminación ambiental generada por excesos de P en el medio. Los precipitados de P de distinto origen presentes en el suelo son arrastrados por el agua de lluvia o el viento a los cursos de agua cercanos, contribuyendo a la eutrofización de las aguas y a los consiguientes problemas relacionados con la disminución de la biodiversidad de los ecosistemas acuáticos y la contaminación de los recursos acuíferos por la presencia de toxinas de origen microbiológico (Conde, 2009).

Por otro lado, este tipo de biofertilizantes de base microbiana podrían beneficiar a las plantas mediante otros mecanismos, ya que podrían sintetizar ciertas hormonas vegetales, liberar sideróforos, servir como control biológico de fitopatógenos, fijar N, aumentar la eficiencia de la fijación biológica de N₂ (FBN) en la simbiosis leguminosa-rizobio, debido a que el P es el factor más limitante en la FBN (Gyaneshwar *et al.*, 2002). En la mayoría de los casos, las dificultades en obtener formulaciones exitosas y el insuficiente conocimiento en la base molecular del proceso ha impedido el desarrollo comercial de estos productos (Idriss *et al.*, 2002).

Otras bacterias que no solubilizan ni mineralizan P podrían también aumentar la fitodisponibilidad del P, debido a que pueden absorber el escaso P soluble a través de sus transportadores de alta afinidad, y este P volverse disponible para las plantas a través de la mineralización que ocurre cuando la bacteria muere (Gyaneshwar *et al.*, 2002).

El desarrollo de plantas transgénicas con fitasas microbianas es otra aproximación para explotar las fuentes de Po en el suelo. Ya se han llevado a cabo varios experimentos de este

tipo, donde se han utilizado plantas transgénicas capaces de expresar genes de fitasas bacterianas (Singh & Satyanarayana, 2011).

1.7. EL CULTIVO DE SOJA

1.7.1. Importancia en Uruguay

La soja es un cultivo agrícola de gran importancia en todo el mundo. Es utilizado como alimento humano y del ganado, para producir aceites, biodiesel, tintas, plásticos, materiales de construcción y lubricantes (Lindrström *et al.*, 2010).

En los últimos años se ha producido una expansión e intensificación de la agricultura en Uruguay y en la región, cuyo denominador común ha sido la creciente y acelerada dominancia del cultivo de soja. Mientras en el año 2001 el país sembraba unas 30 000 ha y exportaba casi 10 000 toneladas de grano de soja, en 2011 esas cifras pasaron a ser de más de 1 500 000 ha y más de 1 000 000 de toneladas de grano exportadas (revisado por Bordoli *et al.*, 2013). Este gran incremento estuvo explicado principalmente por la expansión del área sembrada, producida tanto por el desplazamiento de otros cultivos como por la inclusión de áreas no tradicionales, con suelos que en muchos casos presentan restricciones para la agricultura de secano (Bordoli *et al.*, 2013). En la zafra 2016/2017, se sembraron 1103000 de ha, destacándose el departamento de Soriano con 350 mil ha sembradas (MGAP, 2017a), y el rendimiento promedio estimado fue de 3 026 kg por hectárea (MGAP, 2017b). Por otro lado, la soja es el tercer bien de exportación en el Uruguay, luego de la carne bovina y la celulosa. En 2017, las ventas de soja alcanzaron los US\$ 1 189 millones (Uruguay XXI, 2017).

1.7.2. Fijación biológica del nitrógeno

La soja es una leguminosa capaz de asociarse simbióticamente con bacterias fijadoras de N₂ atmosférico (Nuñez, 2017), como los rizobios, las cuales transforman este N₂ a amonio y luego, las células vegetales asimilan el amonio en forma de aminoácidos y ureidos (Araujo *et al.*, 2008). El cultivo de soja de alto rendimiento presentan un alto requerimiento de N, requiere 80 kg N.ha⁻¹ para producir una tonelada de grano (Nuñez, 2017), y se estima que la FBN puede cubrir entre el 60 y 70% del N requerido (Lindrström *et al.*, 2010).

Los rizobios reportados como asociados a la soja pertenecen a las siguientes especies *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium liaoningense*,

Mesorhizobium tianshanense, *Sinorhizobium fredii* y *Sinorhizobium xinjiangense* (Lindrström *et al.*, 2010).

Debido a que la mayoría de los suelos no tienen una población suficiente de rizobios específicos, la inoculación de la soja es una práctica ampliamente extendida, por lo que la producción comercial de inoculantes es una industria importante (Lindrström *et al.*, 2010).

En Uruguay, desde la década del sesenta la FBN ha sido una política pública a largo plazo. La clave de su éxito ha sido la implementación de una estrategia respaldada por el gobierno, basada en una fuerte relación funcional entre la investigación pública, la industria privada y los agricultores. El registro, la calidad y el uso de los inoculantes son controlados oficialmente por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), el cual recomienda oficialmente las cepas a utilizar y las suministra a la industria, y realiza los controles de calidad de cada lote de inoculantes (Altier *et al.*, 2013). Las cepas *Bradyrhizobium elkanii* U1301 y U1302 son las recomendadas oficialmente para el cultivo de soja en nuestro país (Mayans, comunicación personal). Como resultado de políticas de investigación y extensión, 100% de los agricultores han adoptado esta tecnología de inoculación. Su utilización ha reducido el uso de fertilizantes nitrogenados de síntesis, mejorando la rentabilidad de los agricultores y reduciendo impactos ambientales negativos. Consecuentemente, la simbiosis rizobio-leguminosa ha tenido un efecto significativo en la economía uruguaya, ya que el país ahorra en el orden de US\$ 420 millones por año al reducir la importación de fertilizantes químicos nitrogenados (Lindrström *et al.*, 2010).

1.7.3. El fósforo en la fijación biológica del nitrógeno

La FBN y la asimilación del amonio, que ocurren en los nódulos, son procesos altamente consumidores de energía y dependen del estatus energético de los nódulos (Araújo *et al.*, 2008). Por esto mismo, el contenido de P es mayor en los nódulos comparado con otros órganos vegetales bajo condiciones suficientes y de deficiencia de P. El P tiene un rol crítico en la nodulación y la actividad nodular (Lazali *et al.*, 2016). Por lo antedicho, la deficiencia de P es una gran limitante en la producción de leguminosas donde la nutrición nitrogenada de las mismas depende de la FBN (Araújo *et al.*, 2008). Aproximaciones efectivas para abordar la deficiencia de P, incluyen: 1) aumentar la adquisición de P, utilizando mecanismos como la morfología y exudación radicular; 2) aumentar la adquisición de P, por la micorrización o inoculación con bacterias u hongos solubilizadores y/o mineralizadores de P; 3) selección de

genotipos vegetales con mayores actividades enzimáticas capaces de metabolizar los compuestos fosfatados en el nódulo (Araújo *et al.*, 2008); 4) selección de rizobios noduladores con capacidad solubilizadora y/o mineralizadora de P, capaces de metabolizar las formas complejas de P en el nódulo (Lazali *et al.*, 2016).

Rosas y colaboradores (2006), hallaron que plantas de soja co-inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* TIIIB y *Pseudomonas putida* presentaban un mayor número de nódulos y biomasa comparado con los controles sin inocular con la *Pseudomonas putida*. Pero en el caso de las plantas de alfalfa co-inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 3DOh13 y *Pseudomonas putida*, no se observaron diferencias entre este tratamiento y el control sin inocular con *Pseudomonas putida*. Esto se puede deber a que la *Pseudomonas putida* provee el P a las plantas de soja, pero no en el caso de las plantas de alfalfa, ya que en este caso sería la cepa *Sinorhizobium meliloti* 3DOh13 la que proveería el P a la planta.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

En las colecciones nacionales de rizobios, *Streptomyces* y *Bacillus* hay cepas bacterianas capaces de solubilizar y/o mineralizar fósforo y de promover el crecimiento vegetal aumentando la absorción de fósforo en plantas de soja.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. Objetivo general

Explorar la riqueza biológica existente en colecciones nacionales de rizobios, *Streptomyces* y *Bacillus*, por su capacidad de solubilizar y/o mineralizar fósforo, de aumentar la absorción de fósforo y/o de promover el crecimiento vegetal en plantas de soja.

2.2.2. Objetivos específicos

- ❖ Seleccionar a partir de las colecciones existentes cepas bacterianas de rizobios, *Streptomyces* y *Bacillus* capaces de solubilizar y/o mineralizar distintas fuentes de fósforo *in vitro*.
- ❖ Evaluar la capacidad de la/s cepa/s seleccionada/s de aumentar la absorción de fósforo en plantas de soja y/o de promover el crecimiento vegetal.
- ❖ Estudiar si un gen específico de fitasa rizobiana expresado en los nódulos actúa como uno de los mecanismos implicados en la adquisición y reciclaje de fósforo en la planta de soja.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. GERMOPLASMA BACTERIANO

Se utilizaron 99 cepas pertenecientes a tres colecciones bacterianas existentes en el Laboratorio de Microbiología de Suelos, INIA Las Brujas. Los rizobios forman parte de la Colección Nacional de Rizobios, cuya curaduría es llevada a cabo en el laboratorio. En el caso de los *Streptomyces* y *Bacillus*, se utilizaron cepas aisladas previamente en proyectos ejecutados en el laboratorio.

Se utilizaron 49 cepas pertenecientes a la Colección Nacional de Rizobios, indexada en la *World Federation for Culture Collections* (http://www.wfcc.info/ccinfo/index.php/collection/by_id/1082/), las cuales se muestran en el Anexo II.

Las 40 cepas de *Streptomyces* utilizadas pertenecen a la colección del laboratorio, y fueron aisladas de suelos con diferentes historias de cultivo de un experimento de rotaciones sin laboreo a largo plazo establecido en Paysandú, Uruguay (Vaz *et al.*, 2018). Las diferentes cepas se muestran en el Anexo II.

Se utilizaron 9 cepas pertenecientes a la colección de *Bacillus* presente en el laboratorio. Tres de ellas fueron aisladas de suelo rizosférico y seis de intestino de tucura (*Borellia bruneri*, *Cocytotettix* sp.), en diferentes proyectos previamente realizados en el laboratorio (Abreo *et al.*, en imprenta). A su vez, se utilizó la cepa *Bacillus subtilis* DSM 23778 como control positivo por su actividad mineralizadora de P *in vitro*, ya que esta actividad ha sido previamente reportada en la literatura por Maougal y colaboradores (2014a, 2014b). Esta última, fue adquirida en el Leibniz-Institut DSMZ (Alemania). Las diferentes cepas se muestran en la Anexo II.

Todas las cepas fueron conservadas en glicerol 20 % (v/v) a -80°C, y en particular las cepas de rizobios y *Bacillus* también se conservaron liofilizadas a 4°C. Los cultivos rizobianos se mantuvieron en placas de petri con medio sólido Extracto de Levadura Manitol (YEM, siglas en inglés para *Yeast Extract Manitol*) suplementado con Rojo Congo (RC) 0,0125 mg.L-1 (ANEXO III) (Somasegaran & Hoben, 1994) y en tubos tapa rosca con medio sólido YEM inclinado, ambos a 4°C. Los cultivos de *Streptomyces* se mantuvieron en placas de petri con medio sólido agar-avena (ANEXO III) (Vaz *et al.*, 2018) a 4°C. Por último, los cultivos de *Bacillus* se

mantuvieron en placas de petri con medio sólido Agar de Soja Tríptico (TSA, siglas en inglés para *Tryptic Soy Agar*) (ANEXO III) a 4°C.

3.2. CAPACIDAD DE SOLUBILIZACIÓN Y/O MINERALIZACIÓN DE FÓSFORO *in vitro*

3.2.1. Solubilización y/o mineralización de fósforo en medio sólido

Como primer proceso de selección¹, se evaluó la capacidad de solubilizar y/o mineralizar P en medio sólido de las 99 cepas evaluadas en este trabajo.

Se inocularon 10 µL de una suspensión celular de cada cepa en medio sólido Angle modificado (Maougal *et al.*, 2014b; Angle *et al.*, 1991), suplementado con diferentes fuentes de Pi y Po (ANEXO III). Como fuente de Pi se utilizaron el fosfato de hierro (III) (FePO₄), fosfato de aluminio (AlPO₄) y fosfato tricálcico (Ca₃(PO₄)₂) (Pérez *et al.*, 2007), y como fuente de Po, el fitato de sodio (Maougal *et al.*, 2014b). Como control, se inocularon también 10 µL de una suspensión celular de cada cepa en medio sólido Angle modificado sin fuente de P. Se realizaron tres repeticiones por cada fuente de P. Las placas se incubaron a 28°C, hasta que se observó la aparición de un halo de solubilización y/o mineralización, igualmente nunca se incubó más de 30 días. La aparición de un halo fue considerada como una señal de que la cepa era capaz de solubilizar y/o mineralizar P. Se midió el diámetro del mismo y el de la colonia a los 20 días de incubación, y se calculó el índice de solubilización y/o mineralización, que es igual a la relación entre el diámetro total (diámetro del halo + diámetro de la colonia) y el diámetro de la colonia (Hariprasad & Niranjana; 2009) (Figura 5).

¹ En este texto se utilizará la terminología en inglés: *screening*.

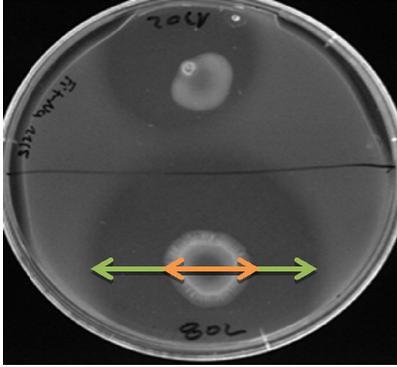


Figura 5. Cuantificación del índice de mineralización de la cepa *Rhizobium tropici* U802, inoculada en medio Angle modificado suplementado con fitato de sodio como fuente de P. La flecha verde señala el diámetro total (diámetro del halo + diámetro de la colonia), y la flecha naranja el diámetro de la colonia.

Con el fin de verificar la estabilidad del fenotipo solubilizador y/o mineralizador de las cepas, se realizaron, al menos, cuatro repiques sucesivos. Las cepas que continuaban produciendo halo de solubilización y/o mineralización, luego de los repiques sucesivos, fueron las seleccionadas para continuar con los ensayos (Jorquera *et al.*, 2008a).

Las suspensiones de microorganismos para cada grupo se prepararon como se describe a continuación. En el caso de los rizobios, se tomaron colonias aisladas de medio sólido YEM suplementado con RC 0,0125 mg.L⁻¹, y se inocularon en tubos que contenían 15 mL de Triptona Extracto de Levadura (TY, siglas en inglés para *Tryptone Yeast*) (ANEXO III) (Beringer, 1974), los cuales se incubaron en un agitador rotatorio a 28°C y 180 rpm hasta que alcanzaron una densidad óptica (DO) de 0,6 a una longitud de onda (λ) de 590 nm, DO correspondiente a una concentración del orden de 10⁸ ufc.mL⁻¹, determinado previamente mediante recuentos en placa. En el caso de los *Streptomyces*, se tomaron colonias aisladas de medio sólido agar-avena, y se inocularon en tubos que contenían 15 mL de Extracto de Levadura Dextrosa (YD, siglas en inglés para *Yeast Dextrose*) (ANEXO III) (Xianzhen, 1997), los cuales se incubaron 168 h en agitador rotatorio a 28°C y 180 rpm. Se realizaron recuentos en placa previos, para estimar que luego de 168 h, los cultivos se encontraban en una concentración del orden de 10⁸ ufc.mL⁻¹. En el caso de los *Bacillus*, se tomaron colonias aisladas de medio sólido TSA, y se inocularon en tubos que contenían 15 mL de Caldo de Soja Trípico (TSB, siglas en inglés para *Tryptic Soy Broth*) (ANEXO III), los cuales se incubaron en agitador rotatorio a 28°C y 180 rpm hasta que alcanzaron una DO de 1,3 a una λ de 600 nm, DO correspondiente a una concentración del orden de 10⁸ ufc.mL⁻¹, determinado previamente mediante recuentos en placa. Para cada grupo, se lavaron las células con el fin de eliminar restos de compuestos

fosforados provenientes de los respectivos medios de cultivo. Para esto, el tubo con el cultivo se centrifugó durante 5 min a 5000 rpm, se descartó el sobrenadante y se le agregó 2 mL de una solución estéril de cloruro de sodio (NaCl) 0,85 % (m/v) (ANEXO III), y se repitieron dos veces más estos mismos pasos.

3.2.2. Mineralización de fósforo en medio líquido

Las cepas formadoras de un halo de mineralización en medio sólido Angle modificado suplementado con fitato de sodio, fueron seleccionadas para cuantificar su capacidad mineralizadora de fitato de sodio en medio líquido Angle modificado (Alikhani *et al.*, 2006).

Las suspensiones de microorganismos fueron preparadas como se describió anteriormente para cada grupo. Se inocularon 500 μ L de una suspensión celular de cada cepa en matraces de 100 mL que contenían 30 mL de medio líquido Angle modificado suplementado con fitato de sodio, como única fuente de P. Se realizaron tres repeticiones para cada cepa. También se sembraron en medio sólido YEM suplementado con RC, en el caso de los rizobios, agar-avena, en el caso de los *Streptomyces*, y TSA, en el caso de los *Bacillus*, con el fin de verificar la pureza de los cultivos de partida. A su vez, se incubaron tres matraces que contenían únicamente medio líquido Angle modificado suplementado con fitato de sodio sin inocular, los cuales se utilizaron como blancos a la hora de determinar la cantidad de P liberado al medio de cultivo por las cepas. Además, de utilizar la cepa de *B. subtilis* DSM 23778 como control positivo, se utilizó una cepa de rizobio, la *R. leguminosarum* bv. *viceae* U336, como control negativo, ya que la misma no había producido un halo de mineralización en el ensayo anterior. Los matraces se incubaron en agitador rotatorio a 28°C y 180 rpm durante 384 h. El día de la inoculación y cada 48 h, los matraces se retiraron del agitador, y se esperó, aproximadamente, 30 min, para que decantaran las células y tomar, así, una alícuota de 1 mL únicamente del sobrenadante del cultivo, sin células, con el fin de determinar la cantidad de P liberado al medio de cultivo por las cepas. A su vez, se verificó la pureza de cada matraz durante todo el período de incubación, como se explico anteriormente. Por último, se midió el pH del medio de cultivo con un electrodo de vidrio de pH el último día de incubación.

La cantidad de P liberado al medio por cada cepa fue determinado espectrofotométricamente mediante el método del vanado-molibdato (Bertramson, 1942). A la alícuota de 1 mL, se le agregó 4 mL de la mezcla colorimétrica, conformada en partes iguales por heptamolibdato de amonio 1,9 % (m/v), vanadato de amonio 0,09 % (m/v) y ácido nítrico 1,5 M (ANEXO III). Luego, se homogeneizó y se esperó 60 min, se centrifugó durante 5 min a

5000 rpm, con el fin de que decantaran los precipitados de fitato que podrían entorpecer la medida, y se midió la absorbancia en espectrofotómetro a una λ de 466nm. La concentración de P liberado al medio por cada cepa, se obtuvo a partir de la interpolación del valor de absorbancia obtenido en una curva de calibración que se realizó en cada momento que se realizaron las medidas. A este valor de concentración de cada cepa, a su vez, se le resto el valor de concentración obtenido para los tratamientos de matraces sin inocular (blancos), que representaban la concentración de P que se encontraban en el medio de por sí. Para realizar la curva de calibración de P en solución, se tomaron alícuotas de 1 mL de soluciones patrón de P de diferentes concentraciones: 0, 5, 10, 20, 35, 50, 75, 100, 130, 170 y 200 mg P.L⁻¹ (ANEXO III), y se les agregó 4 mL de la mezcla colorimétrica y se prosiguió a medir la absorbancia.

3.3. ENSAYOS DE COMPATIBILIDAD

3.3.1. Ensayo de compatibilidad *in vitro*

A partir del ensayo anterior, se seleccionaron ocho cepas que presentaron una mayor actividad mineralizadora, y la cepa control positivo *B. subtilis* DSM 23778, y con las mismas se realizaron ensayos de compatibilidad *in vitro* con las cepas rizobianas recomendadas para la industria, presentes en el inoculante comercial para el cultivo de soja, *Bradyrhizobium elkanii* U1301 y U1302, según el método de Herr's modificado (Pérez *et al.*, 2007).

Las suspensiones de microorganismos fueron preparadas como se describió anteriormente para cada grupo. Se inocularon 10 μ L de una suspensión celular de cada cepa en medio sólido TY en el caso de los rizobios, en medio sólido ISP2 (ANEXO III) (Schirling & Gottlieb, 1966) en el caso de los *Streptomyces*, y en medio sólido TSA en el caso de los *Bacillus*. Las cepas rizobianas se incubaron a 28°C durante 48 h si las cepas eran de crecimiento rápido, o 96 h si las cepas eran de crecimiento lento. Los *Streptomyces* se incubaron también a 28°C durante 120 h y los *Bacillus* a 28°C durante 16 h. Cuando finalizó la incubación, a cada placa se le agregó 15 mL de medio sólido TY fundido y enfriado a, aproximadamente, 40°C. Una vez que solidificaba la sobrecapa, se inoculó 100 μ L de un cultivo de *B. elkanii* U1301, o de *B. elkanii* U1302, o el inoculante comercial para el cultivo de soja formulado, todos en una concentración de 10⁸ ufc.mL⁻¹. El inoculante comercial, originalmente, se encontraba a una concentración de 10⁹ ufc.mL⁻¹, por lo que se realizó una dilución 1/10 con NaCl 0,85 % (m/v). Las placas se incubaron a 28°C durante 96 h. A las 96 h, se observaron y se midieron las zonas de inhibición, que se visualizaron como zonas traslúcidas alrededor de las colonias de las cepas

seleccionadas, y es igual a la relación entre el diámetro de la zona traslúcida y el diámetro de la colonia (Figura 6). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

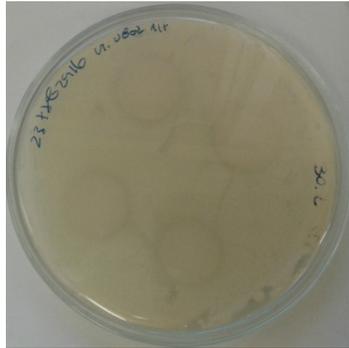


Figura 6. Zonas de inhibición alrededor de las colonias de las cepas seleccionadas.

3.3.2. Ensayo de compatibilidad *in vivo*

Con la cepa de cada grupo bacteriano que presentó una mayor actividad mineralizadora y que no inhibió al inoculante comercial para el cultivo de soja en el ensayo anterior, se realizaron ensayos de compatibilidad *in vivo*. Para esto se co-inocularon plantas de soja con el inoculante comercial, en una concentración de 10^7 ufc.mL⁻¹, y con las cepas seleccionadas, a diferentes concentraciones, 10^7 , 10^6 y 10^5 ufc.mL⁻¹. El experimento tuvo un diseño completamente al azar, con tres repeticiones, donde se utilizó como control plantas de soja inoculadas solamente con el inoculante comercial en una concentración de 10^7 ufc.mL⁻¹.

Semillas del cultivar de soja Nidera 5909 (N5909) se esterilizaron de acuerdo a Beyhaut y colaboradores (2006). Se seleccionaron 300 semillas de buena calidad, sin enfermedades o defectos a simple vista, y, en condiciones de esterilidad, se trasvasaron a un matraz estéril, se les agregó la cantidad suficiente de etanol 95 % (v/v) necesaria para cubrir todas las semillas, se agitó durante 3 min, luego se eliminó el etanol, y se le agregó la cantidad suficiente de hipoclorito de sodio 3 % (v/v) para que cubra todas las semillas, se agitó 3 min, se eliminó el hipoclorito, se enjuagó 5 veces con agua destilada (H₂O_d) estéril y luego, las semillas se dejaron imbibándose 4 h en H₂O_d estéril. Luego de la imbibición, las semillas fueron sembradas, en condiciones de esterilidad, en los sistemas de crecimiento de plantas descritos por Tlustý y colaboradores (2004), denominados “Magentas”, similares a las jarras de Leonard (Figura 7). Se utilizó como sustrato arena:turba, en una proporción 5:1, y la solución nutritiva descrita por Somasegaran y Hoben (1985) (ANEXO III), autoclavados a 121°C durante 40 min.



Figura 7. Sistema de crecimiento denominado Magenta. El sustrato se coloca en la cámara de arriba, donde se siembran las semillas, y en la cámara de abajo la solución nutritiva. Estas dos cámaras se encuentran conectadas mediante un cordón, el cual abastece con solución nutritiva a la cámara que contiene el sustrato, de acuerdo a la necesidad de la planta a medida que crece (Tlusty *et al.*, 2004).

Se sembraron cuatro semillas por Magenta y en cada semilla sembrada se co-inoculó, en condiciones de esterilidad, con 1 mL de inoculante comercial para el cultivo de soja, en una concentración de 10^7 ufc.mL⁻¹, y con 1 mL de las cepas seleccionadas, a diferentes concentraciones, 10^7 , 10^6 y 10^5 ufc.mL⁻¹. Debido a que el inoculante comercial utilizado se encontraba en una concentración de 10^9 ufc.mL⁻¹, se realizaron diluciones seriadas 1/10 con NaCl 0,85 % (m/v) para obtener la concentración deseada. Las suspensiones de microorganismos, también fueron diluidas mediante diluciones seriadas 1/10 con NaCl 0,85 % (m/v) para obtener las diferentes concentraciones utilizadas. Este ensayo fue realizado en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas, a una temperatura de 28°C y con un fotoperíodo de 16 h con una intensidad lumínica de 105 $\mu\text{moles fotones.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Luego de la aparición de las primeras hojas trifoliadas, se dejaron dos plantas por Magenta, las cuales fueron tratadas como unidad experimental.

Las plantas se cosecharon 30 días después de la siembra. Se contaron los nódulos y se secaron a 60°C a peso constante, y se determinó el peso seco. La parte aérea y las raíces se secaron a 60°C a peso constante, y se determinaron sus pesos secos. A su vez, se aislaron rizobios a partir de los nódulos de las plantas de soja co-inoculadas con el inoculante comercial y con la cepa de rizobio seleccionada, de acuerdo a Somasegaran y Hoben (1994), y se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés, *Polymerase Chain Reaction*) de

secuencias repetitivas del ácido desoxirribonucleico (ADN), denominada BOX-PCR, por los cebadores² utilizados (Versalovic *et al.*, 1998), con el fin de corroborar la identidad de las cepas presentes en los nódulos, para corroborar si la cepa de rizobio seleccionada podía competir por espacio nodular con las cepas del inoculante comercial.

Se tomaron tres nódulos por planta para realizar los aislamientos. Primero, se esterilizaron los nódulos superficialmente, en condiciones de esterilidad, los nódulos se sumergieron, durante 40 s, en una solución de etanol 95 % (v/v), luego, se sumergieron, durante 80 s, en una solución de hipoclorito de sodio 4 % (v/v), y, por último, se realizaron tres lavados de 40 s con H₂O_d estéril. Luego, se machacaron los nódulos y se realizaron diluciones seriadas 1/10 en NaCl 0,85% (m/v), hasta la dilución -3. Por último, se tomaron 100 µL de cada dilución y se sembraron en medio sólido YEM suplementado con RC. Las placas se incubaron durante 120 h a 28°C. Luego de las 120 h de incubación, dos tipo de colonias morfológicamente similares a rizobios, se sembraron, mediante estriamiento, en nuevas placas de medio sólido YEM suplementado con RC, con el fin de obtener cultivos puros. Las placas se incubaron a 28°C hasta que se obtuvieron colonias aisladas.

Se realizaron las lisis celulares de las colonias aisladas y de colonias aisladas de las cepas control: *B. elkanii* U1301 y U1302 (inoculante comercial), y de la cepa de rizobio seleccionada en los ensayos anteriores, de acuerdo a Rivas y colaboradores (2001). Para esto, con una punta de pipeta³ estéril se tomó una de las colonias aisladas, y se resuspendió en 25 µL de tampón⁴ de lisis (ANEXO III). Luego, se incubó a 95°C durante 10 min en un baño seco. Se agregaron 225 µL de H₂O estéril y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min. Al finalizar la centrifugación, se tomaron los sobrenadantes para realizar la reacción de BOX-PCR sobre los mismos. Los fragmentos fueron amplificadas con el *primer* BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Versalovic *et al.*, 1998). Las reacciones de PCR se realizaron en 25 µL totales (2,5 µL de *buffer* de reacción 10X, 0,5 µL de desoxinucleótidos (dNTPs) 10 mM, 0,5 µL de cloruro de magnesio (MgCl₂) 25 mM, 1,5 µL de *primer* BOXA1R 10 µM, 1,25 µL de albúmina de suero bovino (BSA, del inglés, *bovine serum albumin*) 20 mg.mL⁻¹, 0,2 µL de Taq polimerasa 5 U.µL⁻¹ (Invitrogen), 1 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) 100% (v/v), 15,8 µL de H₂O estéril y 2 µL de ADN genómico (ADNg) como molde, presente en el sobrenadante de la lisis celular, o 2 µL de H₂O estéril en el caso del control negativo). Las reacciones de PCR fueron

² En este texto se utilizará la terminología en inglés: *primers*.

³ En este texto se utilizará la terminología en inglés: *tip*.

⁴ En este texto se utilizará la terminología en inglés: *buffer*.

realizadas en un termociclador (Eppendorf), utilizándose el siguiente programa: un ciclo inicial de desnaturalización de 7 min a 95°C; luego 30 ciclos de desnaturalización de 1 min a 94°C, de hibridación de los *primers* a 53°C durante 1 min y de extensión de 8 min a 65°C; y finalmente, una etapa de extensión final de 16 min a 65°C (Versalovic *et al.*, 1998). Para visualizar los productos de amplificación obtenidos en la BOX-PCR, se mezclaron 10 µL de cada producto de amplificación y 2 µL de *buffer* de carga⁵ 5X (BIOLINE), y se cargaron en un gel de agarosa 1,5% (m/v) (ANEXO III) horizontal, en *buffer* TAE 1X (ANEXO III). La electroforesis en gel se realizó a 90 V, durante los primeros 30 min y a 120 V, las siguientes 6 h (Versalovic *et al.*, 1998). En la corrida electroforética se utilizó el marcador de peso molecular (MPM) *GeneRuler* 100 pb (ThermoFisher Scientific). Los fragmentos de ADN se observaron por tinción con el colorante de ácidos nucleicos *GoodView* (GENTAUR) y exposición a luz UV en un transiluminador, y se preservaron en forma de imagen utilizando el Gel Logic 212 PRO Imaging System (Carestream Health). El colorante *GoodView* se incluyó en el gel, agregando 0,28 µL del mismo cada 10 mL de TAE 1X.

3.4. ENSAYO DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL Y DE ABSORCIÓN DE FÓSFORO

Con la cepa de cada grupo bacteriano que presentó una mayor actividad mineralizadora, y la cepa control positivo *B. subtilis* DSM 23778, se realizaron ensayos de promoción de crecimiento vegetal, con el fin de verificar si eran capaces de promover el crecimiento vegetal y/o aumentar la absorción de P en las plantas de soja. Para esto se co-inocularon plantas de soja con el inoculante comercial para este cultivo, en una concentración de 10^7 ufc.mL⁻¹, y con las cepas seleccionadas o con la cepa control positivo, *B. subtilis* DSM 23778, a una concentración de 10^7 ufc.mL⁻¹. El experimento tuvo un diseño factorial completamente aleatorizado de dos factores (cepa y dosis de Po) con cuatro niveles para el factor cepa y dos niveles para el factor Po, y seis repeticiones. Semillas del cultivar de soja N5909, se esterilizaron como se explicó anteriormente. Las mismas fueron sembradas en las Magentas, como se explicó anteriormente. Las mismas contenían como sustrato arena:turba, en una proporción 5:1, y como solución nutritiva, se utilizó la solución descrita por Somasegaran y Hoben (1985) modificada, sustituyendo el KH₂PO₄ por fitato de sodio en dos concentraciones diferentes, una concentración de 83,0 nM, la cual corresponde a la misma cantidad de P aportado por el KH₂PO₄ utilizado en la solución de Somasegaran y Hoben (1985), y una concentración de 41,5 nM, la cual corresponde a la mitad de P aportado por el KH₂PO₄

⁵ En este texto se utilizará la terminología en inglés: *loading buffer*.

utilizado en la solución de Somasegaran y Hoben (1985). Cada semilla sembrada se co-inoculó, en condiciones de esterilidad, con 1 mL de inoculante comercial, diluido a una concentración de 10^7 ufc.mL⁻¹, como se explicó anteriormente, y con 1 mL de las cepas seleccionadas y la cepa control positivo, *B. subtilis* DSM 23778, a una concentración de 10^7 ufc.mL⁻¹. Las suspensiones de las cepas seleccionadas y de la cepa DSM 23778 fueron preparados como se describió anteriormente. Los controles, fueron plantas inoculadas únicamente con el inoculante comercial cultivadas bajo las dos concentraciones de fitato utilizadas en este ensayo. A su vez, se realizó un control externo al diseño experimental, donde las plantas se inocularon con *B. elkanii* U1301 y U1302 y se cultivaron en solución nutritiva Somasegaran y Hoben (1985) sin modificar, es decir en P inorgánico no limitante para la planta, en forma de KH₂PO₄. Este ensayo fue realizado en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas, a una temperatura de 28°C y con un fotoperíodo de 16 h con una intensidad lumínica de 105 μ moles fotones.m⁻².s⁻¹. Luego de la aparición de las primeras hojas trifoliadas, se ralearon dos plantas por Magenta, quedando dos plantas por Magenta, las cuales fueron tratadas como unidad experimental.

Las plantas se cosecharon 30 días después de la siembra. Se contaron nódulos y se secaron a 60°C a peso constante, y se determinó su peso seco. También se secó a 60°C a peso constante, y se determinaron el peso seco de la parte aérea y las raíces. A su vez, se molieron las partes aéreas de las plantas de cada tratamiento, y se enviaron al Laboratorio de Suelos, Planta y Agua, INIA La Estanzuela (Uruguay), para cuantificar el contenido de P en la parte aérea de las plantas de soja.

3.5. FITASAS RIZOBIANAS EN LA SIMBIOSIS SOJA-*Bradyrhizobium elkanii*

Con el fin de continuar evaluando la riqueza biológica existente en la Colección Nacional de Rizobios, se estudió más específicamente la expresión *in vitro* e *in situ* (en nódulos) de las fitasas rizobianas de las cepas comerciales para el cultivo de soja, *B. elkanii* U1301 y U1302. Todas las actividades comprendidas dentro del apartado 3.5. fueron realizadas en la unidad mixta de investigación Ecologie Fonctionnelle & Biogéochimie des Sols & des Agroecosystemes (UMR Eco&Sols), CIRAD, INRA, IRD, SupAgro, Montpellier, Francia, bajo la supervisión del Dr. Jean-Jacques Drevon⁶.

⁶ Financiado con una Beca de Movilidad otorgada por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII).

3.5.1. Mineralización de fósforo en medio líquido por *Bradyrhizobium elkanii* U1301 y U1302

Primero, se cuantificó la capacidad de las cepas *B. elkanii* U1301 y U1302 de crecer y mineralizar fitato en medio líquido. Las suspensiones de microorganismos fueron preparadas como se describió anteriormente. Se inocularon 200 μL de una suspensión celular de cada cepa, por triplicado, en matraces de 100 mL que contenían 20 mL de medio líquido Angle modificado, pH 6 y 7, suplementado con fitato de sodio, como única fuente de P. Como control del crecimiento, cada cepa se inoculó por triplicado en medio líquido Angle modificado, pH 6 y 7, suplementado con KH_2PO_4 1,5 mM. Como blanco, se incubaron tres matraces que contenían únicamente medio líquido Angle modificado, pH 6 y 7, suplementado con fitato de sodio sin inocular. Los matraces se incubaron en agitador rotatorio a 28°C y 180 rpm durante 168 h. El día de la inoculación y cada 24 h se tomó una alícuota de 500 μL de cultivo, para medir la DO, y luego, los matraces se retiraron del agitador, y se esperó, aproximadamente, 30 min, para que decantaran las células y tomar, así, una alícuota de 1 mL únicamente del sobrenadante del cultivo, sin células, con el fin de determinar la cantidad de P liberado al medio de cultivo por las cepas, de acuerdo al método verde de malaquita (Ohno & Zibilske, 1991). Al cultivo tomado previamente, se le agregó 500 μL de HCl 1N y se le midió la DO a una λ de 600 nm en un espectrofotómetro.

El sobrenadante tomado previamente, se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min, y se tomó el sobrenadante del mismo. Del cual, se tomaron 200 μL y se depositaron en los pocillos de una microplaca. Luego, a cada pocillo se le agregó 40 μL del Reactivo 1 (ANEXO III), se esperó 10 min, y, se le agregaron 40 μL del Reactivo 2 (ANEXO III). Se agitó despacio y se incubó durante 30 min. Luego, se midió la absorbancia a una λ de 630 nm en un lector de microplacas (Ohno & Zibilske, 1991). La concentración de P liberado al medio por cada cepa, se obtuvo a partir de la interpolación del valor de absorbancia obtenido en una curva de calibración que se realizó en cada momento que se realizaron las medidas. A este valor de concentración de cada cepa, a su vez, se le restó el valor de concentración obtenido para los tratamientos de matraces sin inocular (blancos), que representaban la concentración de P que se encontraban en el medio de por sí. Para realizar la curva de calibración de P en solución, se tomaron alícuotas de 200 μL de soluciones patrón de P de diferentes concentraciones: 0, 5, 10, 20, 30 y 50 μM (ANEXO III), y se depositaron en los pocillos de la misma microplaca donde se cuantificaron los ortofosfatos de las muestras problema y se prosiguió como se explicó anteriormente.

3.5.2. RT-PCR *in vitro* de fitasas rizobianas

Con el fin de evaluar que genes de fitasa expresan las cepas de *B. elkanii* U1301 y U1302, en presencia de fitato de sodio, se realizaron retrotranscripciones-PCR (RT-PCR) *in vitro* utilizando diferentes *primers* de fitasas bacterianas. Todas las mezclas⁷ de reacción y los programas de PCR fueron puestos a punto *de novo* de acuerdo a lo realizado por Maougal y colaboradores (2014a).

Para la extracción de ácido ribonucleico (ARN), las cepas *B. elkanii* U1301 y U1302 se sembraron en medio sólido Angle modificado a pH 6 y 7 suplementado con fitato de sodio, como única fuente de P. Se incubaron a 28°C hasta que se observó un crecimiento sustancioso de las cepas. Luego, en condiciones de esterilidad, se les agregó 2 mL de H₂O ultra pura del tipo miliQ estéril tratada con di-etilpirocarbonato (DEPC) y con un rastrillo de vidrio estéril se despegaron los cultivos bacterianos del medio de cultivo, y se recuperaron en un microtubo estéril libre de ARNasa (autoclavado a 121°C durante 40 min). Se tomaron 450 µL de cultivo de cada microtubo y se transfirieron a un nuevo microtubo estéril con perlas de vidrio de 0,1 mm, libre de ARNasa, y 50 µL de lisozima 200 ng/µL. Luego, se vortexeo y se centrifugó a 5000 g durante 1 min. Se tomó el sobrenadante, y se continuó la extracción de ARN con un *kit* comercial para la extracción de ARN, *RNeasy Plus Mini Kit* (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del mismo. A su vez, se utilizaron las columnas eliminadoras de ADN_g utilizadas en este *kit* para la extracción de ADN_g con el *kit* comercial *DNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del mismo a partir de la adición de etanol y del *buffer* de unión.

Para cuantificar el ARN, se utilizó un *kit* comercial, el *Quanti-iT RiboGreen RNA Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific). Primero, se depositaron, por duplicado para cada muestra, 2 µL del ARN extraído en pocillos de una microplaca oscura. Y en la misma microplaca, se depositaron, por triplicado, 50 µL de soluciones patrón de ARN a diferentes concentraciones, 1 µg.mL⁻¹, 500 ng.mL⁻¹, 100 ng.mL⁻¹, 20 ng.mL⁻¹, 0 ng.mL⁻¹ (ANEXO III), las cuales fueron utilizadas para realizar la curva de calibración. En los pocillos donde se encontraban las muestras problema de ARN extraído, se agregó 48 µL de TE 1X (suministrado por el *kit*). Luego, a todos los pocillos se les agregó 50 µL del fluoróforo *Quanti-iT RiboGreen*, previamente diluído 200 veces en TE 1X. Por último, se midió la fluorescencia en un multilector de fluorescencia de microplacas, con una λ de excitación de 480 nm y una λ de emisión de 520 nm. El ADN_g se

⁷ En este texto se utilizará la terminología en inglés: *mix*.

cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), utilizando como blanco H₂O miliQ estéril.

Para verificar la pureza y la integridad del ARN y ADN_g extraído, se realizó una corrida electroforética de los mismos en un gel de agarosa 1,5 % (m/v), en *buffer* TAE 1X, durante 40 min a 120 V. Se utilizó una mezcla de 5 μ L de ARN o ADN_g extraído y 1 μ L de *loading buffer* 6X (ThermoFisher Scientific), para cargar el gel de agarosa. En la corrida electroforética se utilizó el MPM de ADN *GeneRuler* 1 Kb *Plus* (Thermo Fisher Scientific) y la solución patrón de ARN de 2 μ g.mL⁻¹ suministrada por el kit comercial *Quanti-iT RiboGreen RNA Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific). Los fragmentos de ARN y ADN se observaron por tinción con bromuro de etidio y exposición a luz UV en un transiluminador, y se preservaron en forma de imagen utilizando el Gel Logic 4000 PRO Imaging System (Carestream Health). Para realizar la tinción con bromuro de etidio, luego de la corrida electroforética, el gel de agarosa fue colocado en una solución de bromuro de etidio 1 μ g.mL⁻¹ durante 30 min.

A partir del ARN extraído anteriormente, se realizó una retrotranscripción (RT) específica, utilizando dos *primers* reversos⁸ que se utilizan para amplificar secuencias de fitasas bacterianas, los cuales fueron diseñados en la UMR Eco&Sols. Los mismos fueron diseñados para amplificar selectivamente el ARN y el ADN complementario (ADN_c), no así el ADN_g, previniendo la generación de falsos positivos en las RT-PCR, ya que contenían *mismatched* bases que se podían hibridizar a un ARN blanco a una temperatura de 42°C, temperatura no suficientemente alta para desnaturalizar el ADN_g, y que hacen que presenten una baja afinidad con el ADN_g a altas temperaturas de hibridación (59-62°C). Por lo que, estos *primers* con *mismatched* bases pueden ser utilizados para amplificar selectivamente ADN_c, incluso en presencia de altas cantidades de ADN_g contaminante (Koo & Jaykus, 2000). El primer *primer*, fue diseñado para amplificar fitasas del tipo beta-propeller (BPP), R_BPP (5'-ATTTTCTCCGTCCTGTGCGAC-3'), y el segundo para amplificar fitasas del tipo histidina ácida fosfatasa (HAP), R_HAP (5'-CGCGTATGGTCCATCCTGAA-3'). Las reacciones de RT se realizaron en 25 μ L totales. Para esto, en un microtubo estéril y libre de ARNasa, se agregó 1 μ g de ARN extraído y 3 μ L de los respectivos *primers reverse* 10 μ M. Luego, los microtubos se incubaron, en el termociclador (ThermoFisher Scientific), a 70°C durante 5 min, y a 4°C durante 2 min. Posteriormente, se les agregó 5,00 μ L del *buffer* de reacción 5X, 1,25 μ L de dNTPs 10 mM, 2,50 μ L de BSA 0,1% (m/v), 1,00 μ L de M-MLV transcriptasa reversa 200 U. μ L⁻¹ (ThermoFisher

⁸ En este texto se utilizará la terminología en inglés: *reverse*.

Scientific), y se completó el volumen total con H₂O DEPC. Finalmente, se incubó a 42°C durante 60 min en el termociclador (ThermoFisher Scientific).

Con los productos de la RT anterior (ADNc), se realizó una *touchdown* PCR (TD-PCR), con el fin de verificar si el juego de *primers* diseñados para amplificar las BPPs, F_BPP (5'-GATGCAGCTGATGATCCTGCG-3') y R_BPP, y el otro juego de *primers* diseñado para amplificar las HAPs, F_HAP (5'-CAGTTCACGCCAAAGATGCC-3') y R_HAP, eran capaces de amplificar las respectivas secuencias para estos tipos de fitasas. Las reacciones de TD-PCR se realizaron en 25 µL totales (5 µL de *buffer* de reacción 5X, 1,5 µL de MgCl₂ 25 mM, 0,5 µL de dNTPs 10 mM, 0,5 µL de los respectivos *primers* directos⁹ 10 µM, 0,5 µL de los respectivos *primers reverse* 20 µM, 2,5 µL de BSA 0,1% (m/v), en los casos que correspondía, 0,125 µL de Taq polimerasa 5 U.µL⁻¹ (Invitrogen), 1 µL de ADNc/H₂O miliQ estéril, y se completó el volumen total con H₂O miliQ estéril). Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador (ThermoFisher Scientific), utilizándose el siguiente programa: un ciclo inicial de desnaturalización de 2 min a 95°C; luego 30 ciclos de desnaturalización de 30 s a 95°C, de hibridación de los *primers* en primer lugar a 70°C durante 45 s, luego la temperatura de hibridación se redujo gradualmente, de a 1°C, hasta alcanzar los 60°C, y de extensión a 72°C durante 2 min. Para visualizar los productos de amplificación obtenidos en la TD-PCR se realizó una corrida electroforética como se explicó anteriormente.

Con los productos de la RT anterior, se realizó una PCR con gradiente de temperatura, para determinar la correcta temperatura de hibridación del juego de *primers* F_HAP y R_HAP, y la concentración correcta a utilizar de los mismos en la reacción de PCR final. Para esto último, se ensayaron diferentes combinaciones de concentraciones de *primers forward/reverse*: 10/10 µM, 20/10 µM, 10/20 µM y 20/20 µM. A su vez, se utilizó ADNg como molde, además del ADNc, para evaluar la temperatura en la cual los *primers* con *mismatched* bases eran capaces de hibridarse al ADNg (efecto no deseado). Las reacciones de PCR con gradiente de temperatura se realizaron en 25 µL totales (5 µL de *buffer* de reacción 5X, 1,5 µL de MgCl₂ 25 mM, 0,5 µL de dNTPs 10 mM, 0,5 µL de *primer forward* 10 µM/20 µM, 0,5 µL de *primer reverse* 10 µM/ 20 µM, 2,5 µL de BSA 0,1% (m/v), en los casos que correspondía, 0,125 µL de Taq polimerasa 5 U.µL⁻¹ (Invitrogen), 1 µL de ADNc/ADNg/H₂O miliQ estéril, y 15,875 de H₂O miliQ estéril). Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador (ThermoFisher Scientific), utilizándose el siguiente programa: un ciclo inicial de desnaturalización de 3 min a 94°C; luego 35 ciclos de desnaturalización de 30 s a 94°C, de hibridación de los *primers* a

⁹ En este texto se utilizará la terminología en inglés: *forward*.

63,9°C/63,7°C/63,4°C/62,9°C/62,1°C/61,7°C/61°C/60,4°C/59,8°C/59,4°C/59,1°C/59°C durante 45 s, y de extensión a 72°C durante 45 s; y finalmente, una etapa de extensión final de 3 min a 72°C. Para visualizar los productos de amplificación obtenidos en la PCR con gradiente de temperatura se realizó una corrida electroforética como se explicó anteriormente.

A partir de la puesta a punto que se realizó en los pasos anteriores, se estableció la *mix* de reacción y el programa de PCR final realizando una última PCR utilizando el ADNc y el ADNg obtenidos en pasos anteriores y los *primers* F_HAP y R_HAP. Las reacciones de PCR finales se realizaron en 25 µL totales (2,5 µL de *buffer* de reacción 10X, 0,75 µL de MgCl₂ 50 mM, 0,5 µL de dNTPs 10 mM, 0,625 µL de *primer forward* 10 µM, 0,625 µL de *primer reverse* 20 µM, 0,125 µL de Taq polimerasa 5 U.µL⁻¹ (Invitrogen), 1 µL de ADNc/ADNg/H₂O miliQ estéril, y 18,875 de H₂O miliQ estéril). Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador (ThermoFisher Scientific), utilizándose el siguiente programa: un ciclo inicial de desnaturalización de 3 min a 94°C; luego 35 ciclos de desnaturalización de 30 s a 94°C, de hibridación de los *primers* a 62°C durante 45 s, y de extensión a 72°C durante 45 s; y finalmente, una etapa de extensión final de 3 min a 72°C. Para visualizar los productos de amplificación obtenidos en esta PCR, se realizó una corrida electroforética como se explicó anteriormente.

3.5.3. Cultivo hidroaerónico de soja-*Bradyrhizobium elkanii* U1301 o U1302

Para analizar el desempeño de la simbiosis frente a la deficiencia de P, se hicieron crecer en hidroaerponía los cultivares de soja N5909 y Santa Rosa 532 (SR532), inoculados con las cepas *B. elkanii* U1301 y U1302, por separado. El experimento tuvo un diseño factorial completamente aleatorizado de tres factores (cultivar, cepa y nivel de P) con dos niveles para cada uno de los factores (dos cultivares, dos cepas, dos niveles de P), y 10 repeticiones.

Las semillas de soja, se esterilizaron como se explicó anteriormente y se incubaron en placas de petri con agar-H₂O (agar 15 g/L) a 28°C, hasta que desarrollaron una radícula de 10 cm aproximadamente. Consecuentemente, las plántulas fueron inoculadas con las cepas de *B. elkanii* U1301 y U1302, separadamente, a una concentración de 10⁸ ufc.mL⁻¹. Las suspensiones de microorganismos fueron preparadas como se explicó anteriormente. La inoculación se realizó remojando las plántulas de soja en el cultivo de las respectivas cepas durante 45 min (Tajini *et al.*, 2009). Luego, las plántulas fueron transferidas hacia los sistemas de cultivo hidroaerónico (Figura 8). Se utilizaron dos sistemas de cultivo hidroaerónico, el sistema tipo botella y el sistema tipo cajón (Figura 8). En el primero, se colocaron, en tapones

adaptados especialmente, una semilla por botella. Cada botella contenía 1 L de solución nutritiva descrita por Kalia y Drevon (1985) (ANEXO III), oxigenada por medio de un suministro constante de aire comprimido a un flujo de $400 \text{ mL.planta}^{-1}.\text{min}^{-1}$. En el segundo, se colocaron, en los tapones adaptados, 20 semillas por cajón. Cada cajón contenía 40 L de solución nutritiva de Kalia y Drevon (1985), oxigenada de la misma forma que en el caso de las botellas. Las botellas fueron esterilizadas, a 121°C durante 20 min en autoclave, y los cajones desinfectados con hipoclorito de sodio.



Figura 8. Sistemas de cultivo hidroaerónico. **A**, botella; **B**, cajón.

Durante las dos primeras semanas, la solución nutritiva se suplementó con una solución de urea de “arranque”¹⁰ de $1 \text{ mmol urea.planta}^{-1}$. Luego, la solución nutritiva se cambió cada siete días, y no se le agregó más urea. El pH de la solución nutritiva, fue tamponado en 7, aproximadamente, agregándole un $0,7 \text{ g.L}^{-1}$ de carbonato de calcio (CaCO_3) (Tajini *et al.*, 2009). Las plantas de soja se cultivaron en dos condiciones de P contrastantes, P suficiente (Psuf), $250 \mu\text{mol P.planta}^{-1}$, y P deficiente (Pdef), $75 \mu\text{mol P.planta}^{-1}$ (Kalia & Drevon, 1985).

Este ensayo fue realizado en invernáculo bajo condiciones controladas, a una temperatura de 25°C a la noche y de 35°C durante el día, y con un fotoperíodo de 16 h con iluminación complementaria de $400 \mu\text{mol fotones.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Tajini *et al.*, 2009).

Las plantas se cosecharon 42 días después de la transferencia. Luego, se contaron nódulos y se secaron a 60°C a peso constante, y se determinó su peso seco. También se secó a 60°C a peso constante y se determinaron el peso seco de la parte aérea y las raíces. A su vez, se molieron las partes aéreas de las plantas de los tratamientos inoculados con la cepa de *B.*

¹⁰ En este texto se utilizará la terminología en inglés: *starter*.

elkanii U1301, y se enviaron al Laboratorio Oriental (Uruguay), para cuantificar el contenido de P en planta. A su vez, se recolectaron tres nódulos de tres plantas de los tratamientos inoculados con la cepa de *B. elkanii* U1301, con el fin de fijarlos e incluirlos en parafina, para realizar los cortes histológicos donde se realizaron las RT-PCR *in situ* para los transcritos HAP rizobianos, como se explicará en los siguientes apartados. La recolección de estos nódulos, se realizó en horas tempranas de la mañana, con el fin de disminuir el estrés vegetal causado por las altas temperaturas. A su vez, se trabajó con material libre de ARNasa. Se seleccionaron nódulos con un diámetro no mayor a 5 mm, y se introdujeron en viales de vidrio con H₂O DEPC a 4°C. Luego, se continuó con la fijación e inclusión en parafina, como se explicará a continuación.

3.5.4. Fijación, inclusión en parafina y corte histológico de nódulos de soja

Primero, se realizó la fijación de los nódulos de soja en seguida de la recolección, de acuerdo a Maougal y colaboradores (2014a). Como primer paso, se sacó el H₂O DEPC en la que se encontraban embebidos, y se agregó 4 mL de la solución fijadora (ANEXO III). Los viales fueron colocados en una cámara de vacío, durante 2 h, y se rompió el vacío cada 20 min. Luego de 2 h se cambió el baño de la solución fijadora, y se dejó durante la noche¹¹ a 4°C. Al día siguiente, para eliminar la solución fijadora, se realizaron una serie de lavados:

- 2 lavados con H₂O DEPC durante 5 min
- 2 lavados con tampón fosfato salino (PBS, del inglés, *phosphate buffered saline*) (ANEXO III) 1X durante 10 min
- 1 lavado con PBS 1X + glicina 0,2% (m/v) durante 10 min
- 1 lavado con PBS 1X durante 10 min.

Luego, se continuó con la deshidratación de las muestras, en baños de concentraciones crecientes de etanol y butanol, a temperatura ambiente (TA):

- 1 lavado con etanol 50% (v/v) durante 30 min
- 1 lavado con etanol 70% (v/v) durante 30 min
- 1 lavado con etanol 70% (v/v) durante 1 h
- 1 lavado con etanol 70% (v/v) *overnight* o durante varios días, a una temperatura de 4°C

¹¹ En este texto se utilizará la terminología en inglés: *overnight*.

- 2 lavados con etanol 100% (v/v) durante 1 h
- Al menos, 3 lavados con butanol 100% (v/v) durante 1 a varios días, idealmente 7 días.

Después, se continuó con la impregnación de los nódulos en parafina. Para esto, se realizaron los siguientes lavados:

- 1 lavado con Butanol : SafeSolv en una proporción 2:1 durante 2 h a TA
- 1 lavado con Butanol : SafeSolv en una proporción 1:2 durante 2 h a TA
- 2 lavados con SafeSolv durante 2 h a TA
- 1 lavado con SafeSolv : Parafina en una proporción 3:1 durante 1 h a 54/58°C
- 1 lavado con SafeSolv : Parafina en una proporción 1:1 durante 2 h a 54/58°C
- 1 lavado con SafeSolv : Parafina en una proporción 1:3 durante 2 h a 54/58°C
- 1 lavado con Parafina durante 2 h a 54/58°C
- 1 lavado con Parafina *overnight* a 54/58°C

Al otro día, se realizó la inclusión en parafina. Para esto, los nódulos fueron colocados en moldes donde fueron incluidos en parafina, utilizando un distribuidor de parafina, formándose, así, los bloques de parafina con los que se realizaron los cortes histológicos. Los bloques se conservaron a -20°C. Los cortes histológicos de los nódulos se realizaron de forma transversal con un micrótopo (Micro-cut H1200 Vibrating Microtome, Bio-Rad) con cuchilla estéril (Figura 9). Los mismos fueron de un espesor de 12 µm. Los cortes fueron depositados en portaobjetos tratados con silano para aumentar la adhesión celular. Cada portaobjeto contenían cuatro cortes histológicos de nueve nódulos (tres nódulos de tres plantas de cada tratamiento), en la Figura 10 se muestran con letras los nódulos que originaron cada corte, y la ubicación de los cuatro cortes histológicos en el portaobjetos. Los portaobjetos se secaron a 40°C durante 1 h, en una placa calefactora, y luego se colocaron en la estufa a 37°C durante toda la noche, y posteriormente se conservaron a 4°C.



Figura 9. Corte de un bloque de parafina con nódulos utilizando el micrótomo.

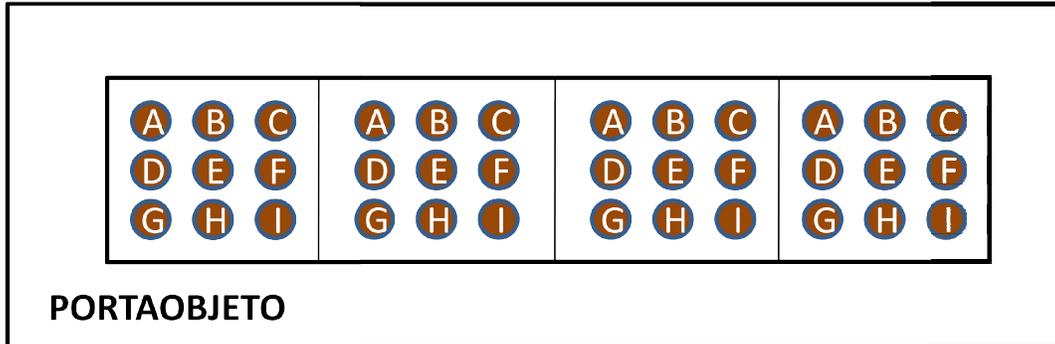


Figura 10. Diagrama de los portaobjetos con cuatro cortes histológicos de nueve nódulos (tres nódulos de tres plantas de cada tratamiento). Los cortes de nódulos con la misma letra provienen de un mismo nódulo.

3.5.5. RT-PCR *in situ* de transcritos HAP rizobianos en nódulos de soja

En los cortes histológicos de nódulos de soja se realizaron RT-PCRs *in situ* de transcritos de fitasas del tipo HAP rizobianas, de acuerdo a Maougal y colaboradores (2014a) y a Lazali y colaboradores (2013), con el fin de estudiar la expresión de este tipo de fitasas en los nódulos de cada tratamiento.

El día previo a realizar las RT-PCRs *in situ*, se observaron los cortes al microscopio óptico, para verificar el estado de los cortes y de los tejidos, y se seleccionaron los cortes en mejor estado, los cuales se incubaron *overnight* a 37°C en la estufa. Solamente, era posible realizar esta técnica en cuatro portaobjetos por vez, sobre dos de ellos se realizaba una RT-PCR *in situ*, y los otros dos restantes eran considerados como control, es decir se les realizaba el mismo

procedimiento pero no se agregaba la enzima transcriptasa reversa en la retrotranscripción. En el momento de la selección, cada corte se seleccionaba para ser una RT-PCR *in situ* o una NO RT-PCR *in situ* (NRT), y por ende, se etiquetaba como tal.

Al día siguiente, se comenzó con el desparafinado de los cortes, mediante una serie de baños, donde se colocaban los portaobjetos en cubas de vidrio (libres de RNAsa) que contenían diferentes soluciones, de acuerdo al siguiente procedimiento:

- 3 baños de SafeSolv durante 10 min
- 1 baño de SafeSolv durante 5 min
- 3 baños de etanol 100% durante 10 min
- 1 baño de etanol 70% durante 5 min
- 1 baño de etanol 50% durante 5 min.

Luego, se continuó con la rehidratación de los cortes, realizando baños de los portaobjetos en cubas de vidrio (libres de RNAsa) que contenían diferentes soluciones, de acuerdo al siguiente procedimiento:

- 1 baño de PBS 1X durante 10 min
- 1 baño de PBS 1X + glicina 0,2% (m/v) durante 2 min
- 1 baño de PBS 1X durante 10 min
- 1 baño de PBS 1X a 65°C durante 5 min

Después de este último baño, los portaobjetos fueron secados con pañuelos descartables, con suma precaución de no tocar los cortes de los nódulos y de eliminar la mayor cantidad posible de líquido, y se les colocó, por encima, una cámara, en las cuales eran introducidas las *mix* de RT, para obtener los ADNc. En esta etapa, se prepararon dos *mix*, una para los cortes donde se realizaron las RT propiamente dichas y la otra para los controles, para los cortes donde se realizaron las NRTs. Las dos se realizaron en un volumen total de 200 μ L. En las *mix* utilizadas en las RTs se mezclaron 40 μ L de *buffer* de reacción 5X, 6,25 μ L de dNTPs 10 mM, 15 μ L del *primer reverse* R_HAP 10 μ M, 20 μ L de BSA 0,1% (m/v), 5 μ L de M-MLV transcriptasa reversa 200 U. μ L⁻¹ (ThermoFisher Scientific) y 113,75 μ L de H₂O DEPC. En el caso de las *mix* utilizadas en las NRTs, se agregaron los mismos componentes, exceptuando la enzima M-MLV transcriptasa reversa, la cual se sustituyó por H₂O DEPC. A cada portaobjeto, se le agregó 100 μ L de su respectiva *mix* de RT o NRT. Luego se incubaron en el termociclador (ThermoFisher Scientific) a 42°C durante 1 h. Una vez finalizada la incubación, se retiró la cámara de los

portaobjetos, y se eliminó la *mix* de RT de los mismos, agregándoles dos veces consecutivas 1 mL de PBS 1X, e introduciéndolos dos veces consecutivas en cubas de vidrio (libres de ARNasa) que contenían PBS 1X durante 10 min. A continuación, se secaron los portaobjetos con pañuelos descartables, y se les volvió a colocar una cámara nueva, donde se introdujo 100 μL de *mix* de PCR. En esta etapa, se realizó únicamente una *mix* de PCR. En un volumen total de 400 μL , se mezcló 40 μL de *buffer* de reacción 10X, 12 μL de MgCl_2 50 mM, 8 μL de dNTPs 10 mM, 4 μL de Digoxigenina-11-uridina trifosfato (Dig-11-dUTP) 1 mM, 10 μL del *primer forward* F_HAP 10 μM , 10 μL del *primer reverse* R_HAP 20 μM , 2 μL de Taq polimerasa 5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (Invitrogen) y 314 μL de H_2O miliQ estéril. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador (ThermoFisher Scientific), utilizándose el programa puesto a punto anteriormente. Finalizada la PCR, se retiró la cámara de los portaobjetos, y se eliminó la *mix* de PCR de los mismos, incubándolos dos veces consecutivas en 1 mL de PBS 1X durante 1 min y en una cuba de vidrio (libre de ARNasa) con PBS 1X durante 10 min. Luego, se incubaron en 1 mL de etanol 100% durante 1 min. El cual se eliminó, incubando los portaobjetos dos veces consecutivas en cubas de vidrio (libres de ARNasa) con PBS 1X durante 10 min.

Luego, se comenzó con el marcaje por inmunodetección, de los ADNs amplificados. Primero, se bloquearon los sitios de unión no específicos, con el fin de prevenir uniones no específicas del anticuerpo. Para esto, se le agregó 1 mL de BSA 2% (m/v) (disuelta en PBS 1X) a cada portaobjeto, y se incubó a 4°C *overnight*. Al día siguiente, se secaron los portaobjetos con pañuelos descartables y se les agregó 1 mL de *buffer* de bloqueo (ANEXO III), y se incubaron, en oscuridad, a 37°C durante 30 min. Luego, se secaron los portaobjetos, y se realizó el marcaje propiamente dicho, agregándoles 1 mL de *buffer* de bloqueo + 4,5 μL de un anticuerpo anti-Digoxigenina conjugado con una fosfatasa alcalina (AP-anti DIG) 0,75 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (SIGMA-ALDRICH), y se incubaron, en oscuridad, a 37°C durante 1h y 30 min. Finalizada la incubación, se eliminó el *buffer* de bloqueo + AP-antiDIG, incubando los portaobjetos dos veces consecutivas en 1 mL de PBS 1X durante 1 min, y, dos veces consecutivas, en cubas de vidrio (libres de ARNasa) con PBS 1X durante 10 min. Después, se continuó con la revelación de la reacción inmunológica. Para esto, se secaron los portaobjetos, se les agregó 150 μL de solución de revelación (ANEXO III), y se incubaron, en oscuridad, a TA durante 30 min. La solución de revelación contenía el sustrato para la fosfatasa alcalina conjugada al anticuerpo anti-Digoxigenina, el ELF-97 (2-(5'-cloro-2-fosforiloxifenil)-6-cloro-4(3H)-quinazolinona) (ThermoFisher Scientific). Este sustrato es soluble en H_2O y presenta una fluorescencia azul débil, pero cuando es desfosforilado por la fosfatasa, pasa a ser un precipitado insoluble en

H₂O y con una fluorescencia intensa y fotoestable amarilla-verde, con una λ de excitación de 360 nm y una λ de emisión de 530 nm (Paragas *et al.*, 1997). Luego, se detuvo la reacción de revelación, incubando los portaobjetos tres veces consecutivas en 1 mL de *buffer* de lavado 1X (ANEXO III) + levamisol 1,2 mg.mL⁻¹ durante 5 min, y dos veces consecutivas en 1 mL de *buffer* de lavado 1X durante 10 min.

Por último, se procedió a realizar los montajes, secando al máximo los portaobjetos para eliminar la máxima cantidad del *buffer* de lavado. Luego, se colocó una gota de ELF-97 medio de montaje (ThermoFisher Scientific), el cual aumenta la fotoestabilidad del fluoróforo, sobre el portaobjeto, y se colocó por encima un cubreobjeto. Luego, los preparados se observaron en un microscopio de fluorescencia con un conjunto de filtros de paso largo Hoechst/DAPI. Para el filtro Hoechst (ELF) se utilizó un tiempo de exposición de 500 ms, y para el filtro DAPI un tiempo de exposición de 350 ms. Las imágenes fueron recuperadas con el *software* ZEISS ZEN Digital Imaging for Light Microscopy (ZEISS), y el procesamiento y análisis de las mismas se realizó con el *software* ImageJ (Schneider *et al.*, 2012).

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para cada variable se obtuvieron los parámetros que describen a las poblaciones muestrales (media y desvío estándar). A los efectos de comparar diferencias entre los distintos aislamientos, para todas las variables se verificaron los supuestos de normalidad con el test de Shapiro-Wilkis y la homogeneidad de varianza con el test de Levene. La variable número de nódulos al no ser una variable continua se le realizó una transformación logarítmica. Para cada variable se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente pruebas de comparación múltiples de medias como el Test de Tukey, y cuando se midió el pH del medio de cultivo Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio inoculado con las cepas formadoras de halo de mineralización, en el ensayo de compatibilidad *in vivo*, y al comparar las variables de peso seco parte aérea, de nódulos, de raíz y número de nódulos entre las plantas de soja cultivadas en fitato de sodio y fósforo no limitante, en forma de KH₂PO₄, obtenidas en los ensayos de promoción de crecimiento vegetal y de absorción de P, se utilizó el Test LSD Fisher para comparar las medias entre los diferentes tratamientos y el control. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el *software* R (R core team, 2018) y se utilizó la librería *agricolae*.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. CAPACIDAD DE SOLUBILIZACIÓN Y/O MINERALIZACIÓN DE FÓSFORO *in vitro*

4.1.1. Solubilización y/o mineralización de fósforo en medio sólido

Los resultados de la evaluación de las 99 cepas de rizobios, *Streptomyces* y *Bacillus* por su capacidad de solubilizar y/o mineralizar diferentes fuentes de P en medio sólido Angle modificado se presentan en la Tabla 4.

En este caso, ninguna de las cepas evaluadas fue capaz de producir un halo de solubilización en medio sólido Angle modificado suplementado con FePO_4 o AlPO_4 , como únicas fuentes de P. Sin embargo, algunas cepas fueron capaces de crecer en alguno de los dos medios, pero no producir halo de solubilización. Por otro lado, se halló que el 45% de los rizobios (22 cepas), 33% de los *Streptomyces* (13 cepas) y 50% de los *Bacillus* (5 cepas) evaluados fueron capaces de producir un halo de solubilización en medio sólido Angle modificado suplementado con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ como única fuente de P. A su vez, se encontró que el 20% de los rizobios (10 cepas), 28% de los *Streptomyces* (11 cepas) y 40% de los *Bacillus* (4 cepas) evaluados fueron capaces de producir un halo de mineralización en medio sólido Angle modificado suplementado con fitato de sodio como única fuente de P. Cabe destacar que todas las cepas mantuvieron estos fenotipos en los cuatro repiques sucesivos en los respectivos medios sólidos.

Tabla 4. Cepas de rizobio, *Streptomyces* y *Bacillus* que crecieron y/o produjeron halo en medio sólido Angle modificado suplementado con FePO_4 o con AlPO_4 o $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ o fitato de sodio, como únicas fuentes de P.

| Cepa | Fuente | | | |
|---------------------------------------|--------------------------------|-----------------|------------------------------|--------------|
| | FePO_4 | AlPO_4 | $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | Fitato de Na |
| | Crecimiento/Desarrollo de Halo | | | |
| U1401* | -/- | -/- | +/- | +/- |
| U204*, U2082*, U315*, U531*, U612* | -/- | -/- | +/+ | -/- |
| U223*, U510*, U1302* | -/- | -/- | +/+ | +/- |
| U705 | -/- | -/- | +/+ | +/+ |
| U104, U221, U667, U724, U806 | -/- | +/- | -/- | -/- |

| | | | | | |
|---------------------|--|-----|-----|-----|-----|
| | U245, U308, U616, U719 | -/- | +/- | +/- | +/- |
| | U809*, U1301* | -/- | +/- | +/+ | +/- |
| | U331* | -/- | +/- | +/+ | +/+ |
| | U206* | +/- | -/- | +/+ | -/- |
| | U262* | +/- | -/- | +/+ | +/- |
| | U143* | +/- | -/- | +/+ | +/+ |
| | U313, U405, U408, U416, U710, U803 | +/- | +/- | +/- | +/- |
| | U102, U276*, U344*, U409, U664, U801/U802, U808* | +/- | +/- | +/+ | +/+ |
| | P21.3, P27.1, P30.10 | -/- | -/- | -/- | +/+ |
| | P27.16 | -/- | -/- | +/- | +/+ |
| | P30.5, P30.12 | -/- | -/- | +/+ | -/- |
| | P21.1, P27.7 | -/- | -/- | +/+ | +/- |
| | P21.7, P27.2, P27.6, P27.12, P27.13, P30.1 | -/- | -/- | +/+ | +/+ |
| <i>Streptomyces</i> | P21.1 | -/- | +/- | -/- | -/- |
| | P21.8, P21.9, P21.11, P21.12, P21.14 | +/- | +/- | -/- | -/- |
| | P27.11 | +/- | +/- | -/- | +/- |
| | P21.15 | +/- | +/- | +/+ | -/- |
| | P21.13 | +/- | +/- | +/+ | +/- |
| | P21.10 | +/- | +/- | +/+ | +/+ |
| | DSM 23778** | -/- | -/- | -/- | +/+ |
| | ILBB 505 | -/- | -/- | +/+ | -/- |
| | ILBB 297 | -/- | -/- | +/+ | +/+ |
| <i>Bacillus</i> | ILBB 210, ILBB 551 | -/- | +/- | +/+ | -/- |
| | ILBB 510, ILBB 582 | +/- | +/- | -/- | +/- |
| | ILBB 224 | +/- | +/- | -/- | +/+ |
| | ILBB 592 | +/- | +/- | +/+ | +/+ |

+ indica crecimiento y/o producción de halo, y - indica no crecimiento y/o no producción de halo, en el medio de cultivo correspondiente. *Cepas recomendadas para su uso comercial en diferentes cultivos en Uruguay. **Control positivo.

En la Tabla 5 se muestran los índices de solubilización para cada cepa inoculada en medio sólido Angle modificado con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. En el caso de los rizobios, la cepa U705 fue la que presentó el mayor índice de solubilización, en promedio, y la cepa U315 la que presentó el menor índice de solubilización, en promedio (Tabla 5). Para los *Streptomyces*, las cepas P21.10 y P27.12 fueron las que presentaron el mayor y menor índice de solubilización, en promedio, respectivamente (Tabla 5). Por último, en el caso de los *Bacillus*, la cepa ILBB 592 presentó el mayor índice de solubilización, en promedio, y la cepa ILBB 210 el menor índice de solubilización, en promedio (Tabla 5).

Tabla 5. Cepas de rizobio, *Streptomyces* y *Bacillus* capaces de solubilizar $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en medio sólido Angle modificado pH 7 con sus respectivos índices de solubilización.

| | Cepa | Índice de Solubilización |
|----------|-------------|--------------------------|
| RIZOBIOS | U315* | 1,10±0,01 J |
| | U331* | 1,14±0,01 I J |
| | U808* | 1,15±0,01 I J |
| | U664 | 1,30±0,20 H I |
| | U344* | 1,36±0,09 G H |
| | U1302* | 1,44±0,08 F G H |
| | U801/U802 | 1,47±0,21 F G H |
| | U223* | 1,50±0,01 F G H |
| | U531* | 1,54±0,09 F G |
| | U204* | 1,56±0,20 F G |
| | U2082* | 1,59±0,28 F |
| | U612* | 1,59±0,45 F |
| | U143* | 1,77±0,25 E |
| | U510* | 1,83±0,58 D E |
| | U102 | 1,87±0,89 C D E |
| | U262* | 1,91±0,34 C D E |
| | U409 | 2,00±0,01 C D |
| | U1301* | 2,01±0,39 B C D |
| | U276* | 2,04±0,91 B C |
| | U809* | 2,25±0,48 A B |
| U705 | 2,27±0,68 A | |

| | | |
|---------------------|----------|---------------|
| <i>Streptomyces</i> | P27.12 | 1,01±0,07 B |
| | P27.7 | 1,04±0,01 A B |
| | P21.5 | 1,24±0,04 A B |
| | P27.2 | 1,27±0,03 A B |
| | P30.5 | 1,32±0,49 A B |
| | P21.13 | 1,56±0,43 A B |
| | P30.12 | 1,63±0,01 A B |
| | P27.13 | 1,77±0,06 A B |
| | P27.6 | 1,79±0,08 A B |
| | P21.15 | 1,87±0,58 A B |
| | P30.1 | 1,96±0,10 A B |
| | P21.7 | 2,00±0,01 A B |
| | P21.10 | 2,06±0,98 A |
| <i>Bacillus</i> | ILBB 210 | 1,55±0,54 B |
| | ILBB 505 | 1,60±0,28 B |
| | ILBB 297 | 1,64±0,33 B |
| | ILBB 551 | 1,87±0,47 A B |
| | ILBB 592 | 2,03±0,12 A |

*Cepas recomendadas para su uso comercial en diferentes cultivos en Uruguay. Los valores de la tabla corresponden a la media de 3 repeticiones \pm desvío estándar (DE). Los tratamientos con una letra en común no son diferentes significativamente ($p > 0,05$). Se utilizó la prueba de comparación múltiple de medias Test de Tukey ($\alpha=0,05$). Análisis de la varianza en ANEXO IV.

En la Tabla 6 se muestran los índices de mineralización para cada cepa inoculada en medio sólido Angle modificado con fitato de sodio. En el caso de los rizobios, la cepa U276 fue la que presentó el mayor índice de mineralización, en promedio, y la cepa U409 la que presentó el menor índice de mineralización, en promedio (Tabla 6). Para los *Streptomyces*, las cepas P21.7 y P21.10 fueron las que presentaron el mayor y menor índice de mineralización, en promedio, respectivamente (Tabla 6). Por último, en el caso de los *Bacillus*, las cuatro cepas productoras de halos de mineralización presentaron, en promedio, índices de mineralización muy similares, por lo que no hubo diferencias significativas entre ellas (Tabla 6).

Tabla 6. Cepas de rizobio, *Streptomyces* y *Bacillus* capaces de mineralizar fitato de sodio en medio sólido Angle modificado pH 7 con sus respectivos índices de mineralización.

| | Cepa | Índice de Mineralización |
|----------------------------|-------------|--------------------------|
| RIZOBIOS | U409 | 1,05±0,07 E |
| | U801/U802 | 1,15±0,07 D E |
| | U808* | 1,15±0,07 D E |
| | U705 | 1,26±0,13 C D E |
| | U331* | 1,30±0,01 C D E |
| | U102 | 1,37±0,06 B C D E |
| | U664 | 1,57±0,12 B C D |
| | U143* | 1,57±0,24 B C D |
| | U344* | 1,80±0,26 A B |
| | U276* | 2,19±0,09 A |
| <i>Streptomyces</i> | P21.10 | 0,87±0,06 C |
| | P27.16 | 1,06±0,01 B C |
| | P27.1 | 1,10±0,01 B C |
| | P27.2 | 1,10±0,01 B C |
| | P30.1 | 1,11±0,06 B C |
| | P21.3 | 1,11±0,08 B C |
| | P30.10 | 1,30±0,01 A B C |
| | P27.6 | 1,40±0,01 A B C |
| | P27.12 | 1,45±0,07 A B C |
| | P27.13 | 1,60±0,01 A B |
| P21.7 | 1,90±0,14 A | |
| <i>Bacillus</i> | DSM 23778** | 1,05±0,02 A |
| | ILBB 224 | 1,05±0,04 A |
| | ILBB 297 | 1,07±0,03 A |
| | ILBB 592 | 1,07±0,03 A |

*Cepas recomendadas para su uso comercial en diferentes cultivos en Uruguay. **Control positivo. Los valores de la tabla corresponden a la media de 3 repeticiones \pm DE. Los tratamientos con una letra en común no son diferentes significativamente ($p > 0,05$). Se utilizó la prueba de comparación múltiple de medias Test de Tukey ($\alpha=0,05$). Análisis de la varianza en ANEXO IV.

4.1.2. Mineralización de fósforo en medio líquido

A las cepas que formaron un halo de mineralización en medio sólido Angle modificado suplementado con fitato de sodio, se les cuantificó su capacidad de mineralizar fitato de sodio en medio líquido Angle modificado, pH 7, midiendo el P liberado al medio de cultivo, a partir de la mineralización del fitato de sodio. En la Figura 11, se muestra las actividades

mineralizadoras de cada grupo de cepas a las 144 y 336 h de incubación en el medio líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio.

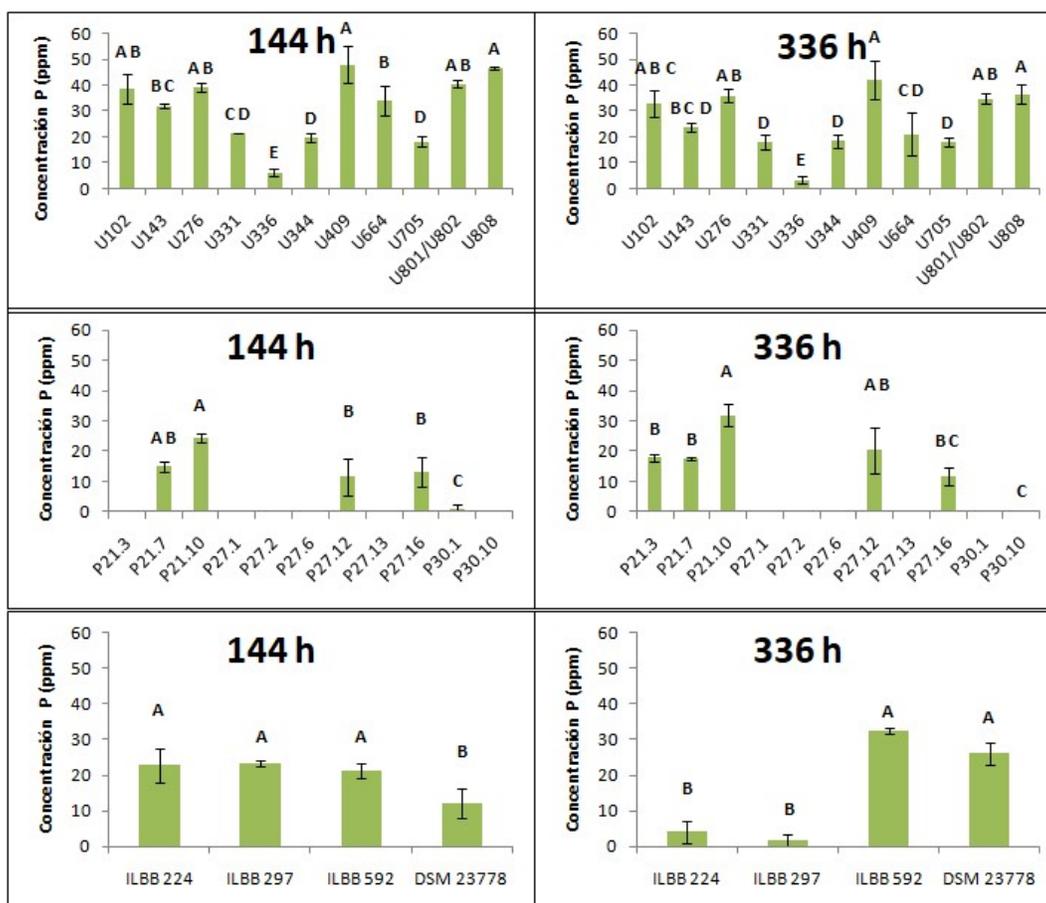


Figura 11. Actividad mineralizadora de fitato de sodio, expresada como P liberado al medio de cultivo, de cada cepa a las 144 h y 336 h de incubación en el medio líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio. Los valores (barras del gráfico) corresponden a la media de 3 repeticiones \pm DE (líneas verticales). Los tratamientos con una letra en común no son diferentes significativamente ($p > 0,05$). Se utilizó la prueba de comparación múltiple de medias Test de Tukey ($\alpha=0,05$). Análisis de la varianza en ANEXO IV. Arriba, cepas rizobianas; al centro, cepas pertenecientes al género *Streptomyces*; debajo, cepas pertenecientes al género *Bacillus*. La cepa *R. leguminosarum* bv. *viceae* U336 se utilizó como control negativo, y la cepa *B. subtilis* DSM 23778 como control positivo.

En la Figura 11, se observa que la mayoría de las cepas rizobianas presentan una alta actividad mineralizadora, exceptuando las cepas U331, U344 y U705, que presentaron una

menor actividad. Por otro lado, la cepa U336, que se utilizó como control negativo, ya que no produjo halo de mineralización, presentó una mínima actividad mineralizadora, estadísticamente menor al resto de las cepas rizobianas (Figura 11) ($p < 0,05$). Las cepas U409, U808, U801/U802, U276 y U102 fueron las cepas que presentaron una mayor actividad mineralizadora (Figura 11), por lo que fueron seleccionadas para continuar con los ensayos de compatibilidad con las cepas comerciales presentes en el inoculante para el cultivo de soja, *B. elkanii* U1301 y U1302. Si bien no hay diferencias significativas entre estas cinco cepas seleccionadas, hay una tendencia de las cepas U409 y U808 a presentar una mayor actividad mineralizadora.

En cuanto a los *Streptomyces*, en la Figura 11 se observa que una gran parte de las cepas estudiadas no fueron capaces de liberar P al medio de cultivo, en el tiempo de incubación estudiado. Sin embargo, la cepa P21.10 presentó la mayor actividad mineralizadora (Figura 11), en promedio, a las 144 y 336 h de incubación, seguida por la cepa P21.7, que a las 144 h de incubación no presentó diferencias significativas con la cepa P21.10, por lo que ambas se seleccionaron para continuar con los ensayos de compatibilidad con las cepas *B. elkanii* U1301 y U1302.

En cuanto a los *Bacillus*, se observó que las cuatro cepas evaluadas presentaron una alta actividad mineralizadora (Figura 11). A las 144 h de incubación, las cepas de la colección no presentaron diferencias significativas entre ellas, pero sí con la cepa utilizada como control positivo, *B. subtilis* DSM 23778, la cual presentó una actividad mineralizadora menor (Figura 11) ($p < 0,05$). Sin embargo, a las 366 h de incubación, la cepa ILBB 592 y la cepa *B. subtilis* DSM 23778 fueron las que presentaron una mayor actividad mineralizadora y se diferenciaron estadísticamente de las otras dos cepas de la colección evaluadas (Figura 11) ($p < 0,05$), por lo que se seleccionaron estas dos primeras para continuar con los ensayos de compatibilidad con las cepas *B. elkanii* U1301 y U1302.

Cabe destacar que las cepas rizobianas fueron capaces de liberar al medio de cultivo mayores concentraciones de P, por ende presentaron una mayor actividad mineralizadora que las cepas de *Streptomyces* y *Bacillus* (Figura 11).

A su vez, se determinó el pH del medio de cultivo el último día de incubación, con el fin de evaluar si las cepas eran capaces de acidificar el medio, favoreciendo, la liberación de los iones ortofosfato a partir del fitato de sodio, resultados que se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. pH del medio de cultivo líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio en el último día de incubación (día 16) inoculado con las cepas de cada grupo. El blanco corresponde al medio de cultivo sin inocular.

| | Cepa | pH |
|---------------------|--------------|--------------|
| RIZOBIOS | U102 | 5,65±0,47*** |
| | U143 | 5,38±0,05*** |
| | U276 | 6,28±0,06*** |
| | U331 | 6,85±0,19 |
| | U336* | 6,85±0,11 |
| | U344 | 5,97±0,09*** |
| | U409 | 6,49±0,03*** |
| | U664 | 4,96±0,1*** |
| | U705 | 4,47±0,04*** |
| | U801/U802 | 6,48±0,09*** |
| Streptomyces | U808 | 6,17±0,03*** |
| | P21.3 | 5,96±0,07*** |
| | P21.7 | 6,49±0,08*** |
| | P21.10 | 6,28±0,13*** |
| | P27.1 | 6,71±0,23 |
| | P27.2 | 6,55±0,64*** |
| | P27.6 | 5,71±0,40*** |
| | P27.12 | 5,29±0,19*** |
| | P27.13 | 4,81±0,37*** |
| | P27.16 | 4,97±0,31*** |
| P30.1 | 5,81±0,90*** | |
| P30.10 | 6,22±0,19*** | |
| Bacillus | ILBB 224 | 6,92±0,04 |
| | ILBB 297 | 6,85±0,08 |
| | ILBB 592 | 6,91±0,04 |
| | DSM 23778** | 6,23±0,44*** |
| BLANCO | - | 6,88±0,21 |

* Control negativo. ** Control positivo. Los valores de la tabla corresponden a la media de 3 repeticiones \pm DE. *** Indica que los tratamientos son diferentes significativamente al blanco (medio líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio sin inocular) ($p > 0,05$). Se utilizó el Test LSD Fisher para comparar las medias entre los diferentes tratamientos y el blanco ($\alpha=0,05$). Análisis de la varianza en ANEXO IV.

Como se observa en la Tabla 7, la mayoría de las cepas rizobianas acidificaron el medio de cultivo, llegando a valores de pH de 4,47±0,04. El control negativo, *R. leguminosarum* bv. *viciae* U336, no acidificó el medio de cultivo (6,85±0,11), ya que no presentó diferencias significativas con el blanco. En el caso de los *Streptomyces* sucedió lo mismo que con las cepas rizobianas, la mayoría acidificaron el medio de cultivo. La cepa P21.10, que presentó la mayor

actividad mineralizadora, en promedio, en el caso de los *Streptomyces*, acidificó levemente el medio de cultivo ($6,28 \pm 0,13$), sucediendo lo mismo con las cepas rizobianas U409 y U808, dos cepas que presentaron una mayor actividad mineralizadora, en promedio, en el caso de los rizobios y que acidificaron levemente el medio ($6,49 \pm 0,03$ y $6,17 \pm 0,03$, respectivamente). Por último, en el caso de los *Bacillus*, las tres cepas de la colección, mantuvieron el pH del medio de cultivo neutro, no presenta diferencias significativas con el pH del blanco. En cuanto, al control positivo, *B. subtilis* DSM 23778, la misma fue capaz de acidificar levemente el medio ($6,23 \pm 0,44$), presentando diferencias significativas con el blanco ($p < 0,05$).

4.2. ENSAYOS DE COMPATIBILIDAD

4.2.1. Ensayo de compatibilidad *in vitro*

Con las cepas seleccionadas anteriormente, se realizaron ensayos de compatibilidad *in vitro*, entre éstas y las cepas rizobianas recomendadas para la industria, presentes en el inoculante comercial para el cultivo de soja, *B. elkanii* U1301 y U1302, cuyos resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Halos de inhibición obtenidos en los ensayos de compatibilidad *in vitro* entre las cepas seleccionadas y las cepas *B. elkanii* U1301, U1302 y el inoculante comercial para el cultivo de soja formulado.

| | Cepa | U1301 | U1302 | INOCULANTE COMERCIAL PARA SOJA |
|---------------------|------------|-----------------|-----------------|--------------------------------------|
| RIZOBIOS | U102 | NI | NI | NI |
| | U276 | NI | NI | NI |
| | U409 | NI | NI | NI |
| | U801/U802 | NI | NI | NI |
| | U808 | NI | NI | NI |
| <i>Streptomyces</i> | P21.7 | $1,68 \pm 0,37$ | $1,81 \pm 0,39$ | $2,14 \pm 0,49$ |
| | P21.10 | NI | NI | NI |
| <i>Bacillus</i> | ILBB 592 | $1,05 \pm 0,02$ | NI | NI |
| | DSM 23778* | $1,08 \pm 0,02$ | $1,06 \pm 0,03$ | NI |

NI indica que no hubo inhibición. * Control positivo por su actividad mineralizadora de fitato *in vitro*. Los valores de la tabla corresponden a la media de 12 repeticiones \pm DE.

Como se observa en la Tabla 8, ninguna cepa rizobiana inhibió el crecimiento *in vitro* de la cepa *B. elkanii* U1301, o de la cepa *B. elkanii* U1302 o del inoculante comercial para el cultivo de soja formulado. Por lo que se seleccionó la cepa *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409, que había presentado una alta actividad mineralizadora, para continuar con los ensayos de compatibilidad *in vivo* y de promoción de crecimiento vegetal y de absorción de P.

En el caso de los *Streptomyces*, la cepa P21.7 inhibió el crecimiento *in vitro* de ambas cepas de *B. elkanii* (U1301 y U1302) y del inoculante comercial para el cultivo de soja formulado (Tabla 8). La cepa que presentó una mayor actividad mineralizadora, *S. chartreusis* P21.10, no inhibió el crecimiento *in vitro* de ninguna de las dos cepas ni del inoculante formulado (Tabla 8), por lo que se seleccionó para continuar con los siguientes ensayos en planta.

Por último, la cepa *B. megaterium* ILBB 592 inhibió el crecimiento *in vitro* de la cepa *B. elkanii* U1301, pero no el crecimiento *in vitro* de la otra cepa que conforma el inoculante comercial ni al inoculante mismo (Tabla 8). Por lo que, se continuó estudiando la compatibilidad de esta cepa con el inoculante comercial para soja, mediante ensayos de compatibilidad *in vivo* en plantas de soja. Similarmente, la cepa *B. subtilis* DSM 23778, inhibió el crecimiento de ambas cepas por separado (U1301 y U1302), pero no inhibió sus crecimientos cuando se encontraban juntas en el inoculante comercial formulado (Tabla 8).

4.2.2. Ensayo de compatibilidad *in vivo*

Con el fin de verificar si las cepas seleccionadas anteriormente eran compatibles con el inoculante comercial para soja, se co-inocularon plantas de soja con el inoculante comercial, en una concentración de 10^7 ufc.mL⁻¹, y con las cepas seleccionadas, a diferentes concentraciones, 10^7 , 10^6 y 10^5 ufc.mL⁻¹. Treinta días después de la siembra se les determinó el peso seco de parte aérea, raíz, nódulos y número de nódulos, resultados que se muestran en la siguiente figura.

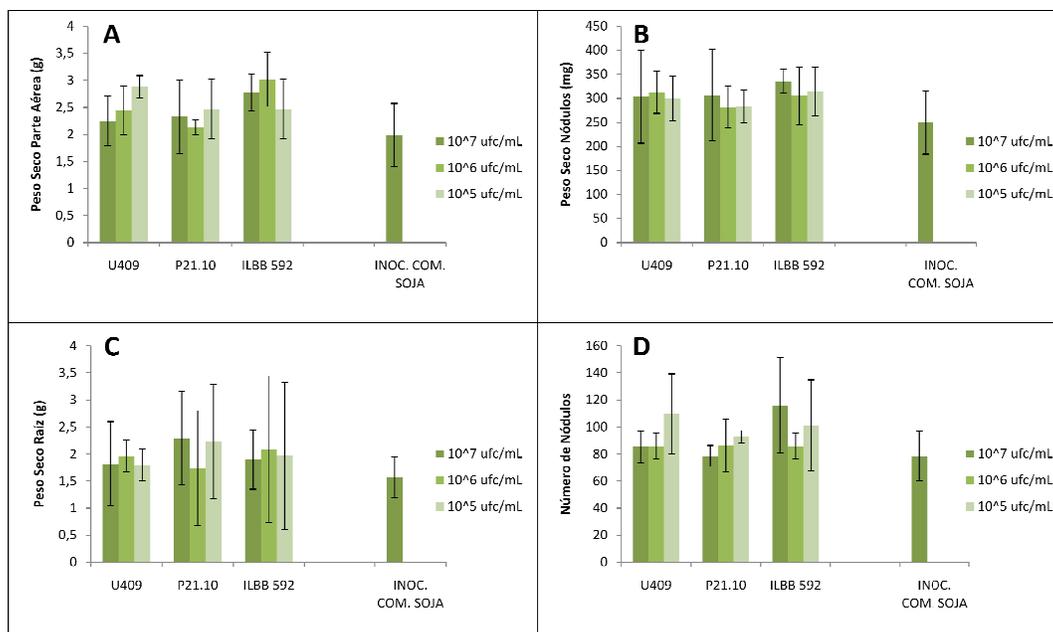


Figura 12. A, peso seco de parte aérea; B, peso seco de nódulos; C, peso seco de raíz; D, número de nódulos, de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 y con *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409 o *S. chartreusis* P21.10 o *B. megaterium* ILBB 592, o únicamente inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (INOC. COM. SOJA). Los valores (barras del gráfico) corresponden a la media de 3 repeticiones \pm DE (líneas verticales). No hubo diferencias significativas entre los tratamientos y el control (plantas de soja inoculadas con INOC. COM. SOJA a una concentración de 10^7 ufc.mL⁻¹) ($p > 0,05$). Se utilizó el Test LSD Fisher para comparar las medias entre los diferentes tratamientos y el control ($\alpha=0,05$). Análisis de la varianza en ANEXO IV. El número de nódulos se transformó logarímicamente.

Como se observa en la Figura 12, ningún tratamiento presentó diferencias estadísticas con el control (plantas de soja inoculadas solamente con el inoculante comercial) para ninguno de los cuatro parámetros determinados en esta ocasión, peso seco de parte aérea, de raíz, de nódulos y número de nódulos. Cuando las cepas fueron inoculadas a 10^7 ufc.mL⁻¹, no hubo diferencias significativas entre estas plantas y el control, por lo que se podría afirmar que las cepas inoculadas a esta concentración, no estarían inhibiendo el desarrollo nodular, ni vegetal en general, razón por la cual se continuó trabajando con estas cepas y se decidió inocularlas en esta concentración a la hora de realizar los ensayos de promoción de crecimiento vegetal y de absorción de P.

A su vez, con el fin de responder a la interrogante de si la cepa U409 se recupera de adentro de los nódulos de soja, se aislaron rizobios a partir de los nódulos esterilizados superficialmente de las plantas de soja co-inoculadas con el inoculante comercial y la cepa U409, inoculada a diferentes concentraciones. Como se observa en la Figura 13, se aislaron dos morfotipos rizobianos a partir de estos nódulos, un morfotipo de colonias pequeñas, similares a las colonias formadas por las cepas de *B. elkanii* U1301 y U1302, las cuales se aislaron en mayor abundancia, incontables en todas las diluciones (M1), y un segundo morfotipo de colonias de mayor tamaño, similares a las colonias formadas por la cepa *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409, las cuales se aislaron en menor abundancia, entre cuatro y cinco colonias únicamente en la dilución -1 (M2), a diluciones mayores de -1 no se encontró este M2. A su vez, se encontró un tercer morfotipo, que no correspondía a los morfotipos usuales rizobianos, ya que el mismo presentaba una coloración rojiza, por lo que se lo consideró como contaminante u otro tipo de cepa no rizobiana presente en el nódulo (M3).

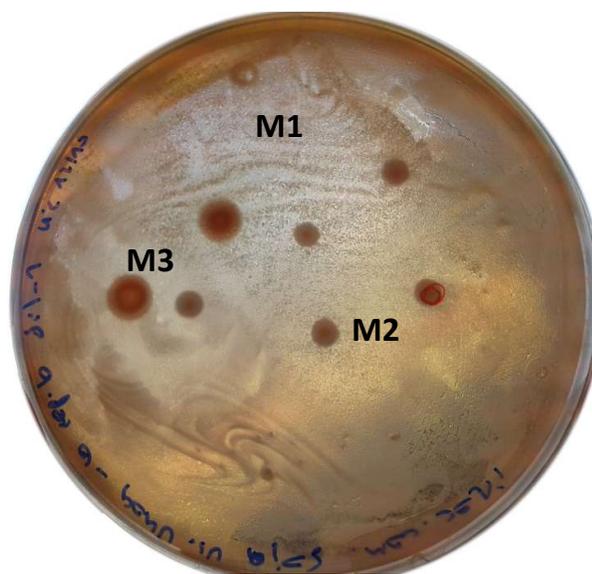


Figura 13. Aislamientos obtenidos a partir de los nódulos de plantas de soja co-inoculadas con el inoculante comercial para este cultivo y la cepa *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409 a una concentración de 10^6 ufc.mL⁻¹. En este caso, se muestra la dilución -1 realizada al momento del aislamiento. M1 indica el morfotipo 1 (similar a *B. elkanii* U1301 y U1302); M2 indica el morfotipo 2 (similar a *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*); M3 indica el morfotipo 3 (no rizobiano).

Al comparar el patrón de bandas obtenidos mediante BOX-PCR para cada aislamiento con el patrón de bandas obtenido para las cepas de *B. elkanii* U1301 y U1302 y para la cepa *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409, se corroboró que las colonias con morfotipos M1 presentaban el mismo patrón de bandas que las colonias de *B. elkanii* U1301, confirmando que estas colonias correspondían a la cepa U1301; y se corroboró que las colonias con morfotipos M2 presentaban el mismo patrón de bandas que las colonias de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409, confirmando que estas colonias correspondían a la cepa U409 (Figura 14).

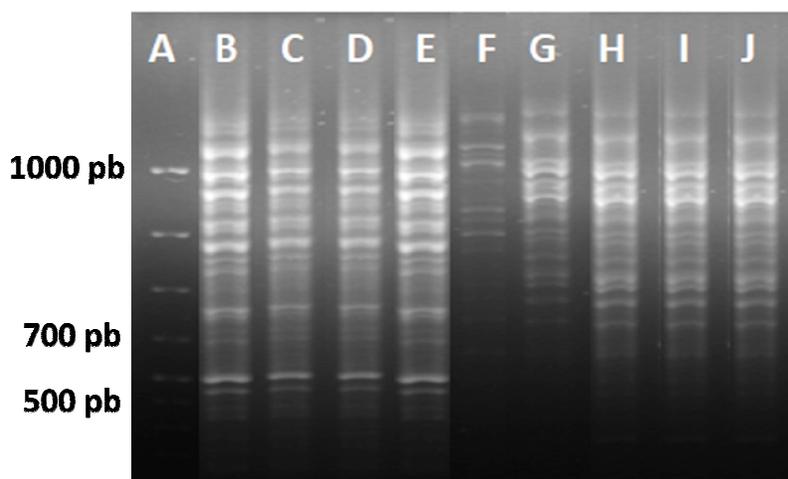


Figura 14. Perfil electroforético de los patrones de banda obtenidos al realizar una BOX-PCR de colonias aisladas con M1 y M2 a partir nódulos de plantas de soja co-inoculadas con la cepa *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409 y con el inoculante comercial. Carriles: **A**, MPM *GeneRuler* 1000 pb (ThermoFisher Scientific); **B**, patrón tipo U409; **C**, M2 aislado de nódulos de plantas inoculadas con U409 (10^7 ufc.mL⁻¹); **D**, M2 aislado de nódulos de plantas inoculadas con U409 (10^6 ufc.mL⁻¹); **E**, M2 aislado de nódulos de plantas inoculadas con U409 (10^5 ufc.mL⁻¹); **F**, patrón tipo U1302; **G**, patrón tipo U1301; **H**, M1 aislado de nódulos de plantas inoculadas con U409 (10^7 ufc.mL⁻¹); **I**, M1 aislado de nódulos de plantas inoculadas con U409 (10^6 ufc.mL⁻¹); **J**, M1 aislado de nódulos de plantas inoculadas con U409 (10^5 ufc.mL⁻¹).

4.3. ENSAYO DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL Y DE ABSORCIÓN DE FÓSFORO

Finalmente, se realizaron ensayos de promoción de crecimiento vegetal, con el fin de verificar si las cepas seleccionadas eran capaces de promover el crecimiento vegetal, y/o aumentar la absorción de P en plantas de soja, las cuales se co-inocularon en plantas de soja, a una concentración de 10^7 ufc.mL⁻¹, junto con el inoculante comercial, también a 10^7 ufc.mL⁻¹. Las mismas se cultivaron en fitato de sodio 41,5 y 83 nM. A su vez, se realizó un control

externo, plantas de soja inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 cultivadas en P inorgánico no limitante, es decir en forma de KH_2PO_4 . Treinta días después de la siembra se les determinó el peso seco de parte aérea, raíz, nódulos, número de nódulos y P acumulado en parte aérea, resultados que se muestran en las figuras 15 y 16.

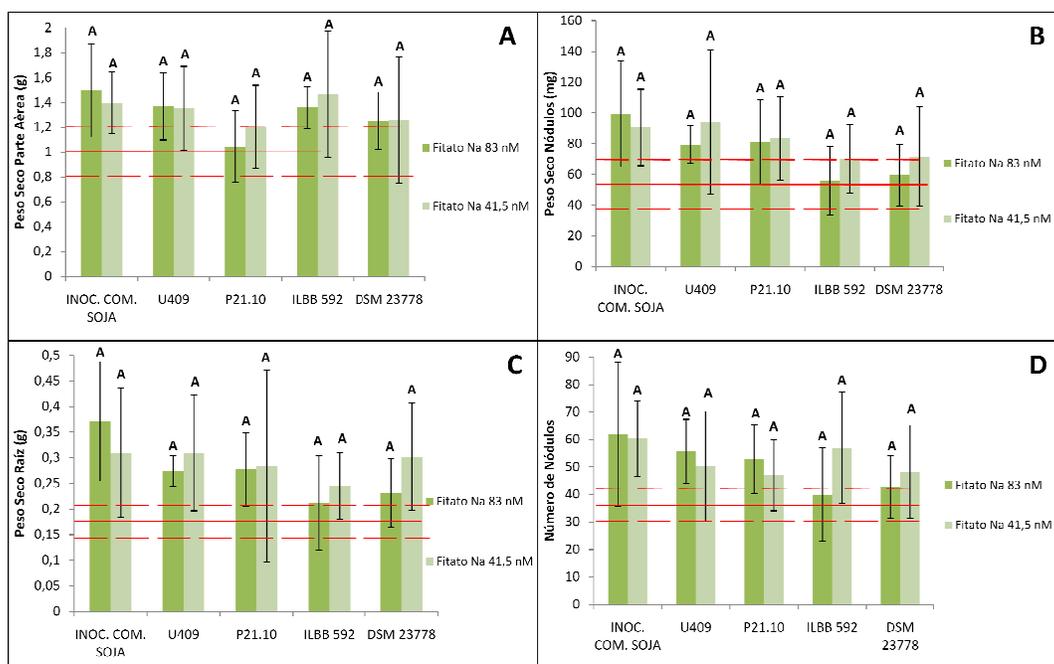


Figura 15. A, peso seco de parte aérea; B, peso seco de nódulos; C, peso seco de raíz; D, número de nódulos, de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 y con *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409 o *S. chartreusii* P21.10 o *B. megaterium* ILBB 592 o *B. subtilis* DSM 23778, o únicamente inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (INOC. COM. SOJA). Las barras verde oscuro representan la condición de P orgánico en forma de fitato de sodio 83 nM, y las barras verde claro representan la condición de P orgánico en forma de fitato de sodio 41,5 nM. Los valores (barras del gráfico) corresponden a la media de 6 repeticiones \pm DE (líneas verticales). Los tratamientos con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). Se utilizó la prueba de comparación múltiple de medias, Test de Tukey ($\alpha = 0.05$). Análisis de la varianza en ANEXO IV. El número de nódulos se transformó logaritmicamente. La línea roja horizontal entera corresponde a la media de 6 repeticiones del control externo, plantas de soja inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 cultivadas en P inorgánico no limitante (KH_2PO_4), \pm DE (líneas rojas horizontales punteadas).

Como se observa en la Figura 15, no se obtuvieron diferencias significativas entre las cepas evaluadas y el inoculante comercial para el cultivo de soja en cuanto al peso seco de parte aérea, de raíz y de nódulos, y el número de nódulos, y no hubo interacción entre los factores cepa y dosis de fitato de sodio para ninguna de las cuatro variables evaluadas (ANEXO IV). A su vez, se observa que las plantas cultivadas a ambas concentraciones de fitato de sodio presentaron significativamente ($p < 0,05$) mayores pesos secos de parte aérea (p -valor=0,0156 para fitato de sodio 41,5 nM, p -valor=0,0195 para fitato de sodio 83 nM), nódulos (p -valor=0,0079 para fitato de sodio 41,5 nM, p -valor=0,0105 para fitato de sodio 83 nM) y raíz (p -valor=0,0266 para fitato de sodio 41,5 nM, p -valor=0,0023 para fitato de sodio 83 nM), y número de nódulos (p -valor=0,0005 para fitato de sodio 41,5 nM, p -valor=0,0229 para fitato de sodio 83 nM), que las plantas cultivadas en P inorgánico no limitante, en forma de KH_2PO_4 (Figura 15) (ANEXO IV). Razón por la cual se continuó estudiando el aporte de los rizobios noduladores de soja (*B. elkanii* U1301 y U1302) a la adaptación de la simbiosis a la deficiencia de P.

Por otro lado, cuando se analizó el P acumulado, se observó que las plantas de soja inoculadas con la cepa ILBB 592 y cultivadas en solución nutritiva con Po en forma de fitato de sodio 83 nM aumentaron significativamente ($p < 0,05$) el P en su parte aérea si se compara con las plantas de soja solamente inoculadas con el inoculante comercial y cultivadas en fitato de sodio 41,5 nM (Figura 16) (ANEXO IV). Las plantas de soja inoculadas con la cepa U409 y con la cepa P21.10 cultivadas en ambas concentraciones de fitato de sodio, no presentaron diferencias significativas con los controles (plantas de soja solamente inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302). Por último, las plantas inoculadas con la cepa utilizada como control positivo para la mineralización de fitato de sodio *in vitro*, DSM 23778, cultivadas en solución nutritiva con fitato de sodio 83 nM, fueron las que acumularon una menor cantidad de P, en promedio, presentando diferencias significativas ($p < 0,05$) con las plantas inoculadas con ILBB 592 y cultivadas en solución nutritiva con fitato de sodio 83 nM (Figura 16). Las plantas inoculadas con esta cepa control positivo cultivadas en fitato de sodio 41,5 nM acumularon significativamente ($p < 0,05$) mayor P que el mismo tratamiento cultivado en fitato de sodio 83 nM (Figura 16). Efecto observado únicamente con esta cepa.

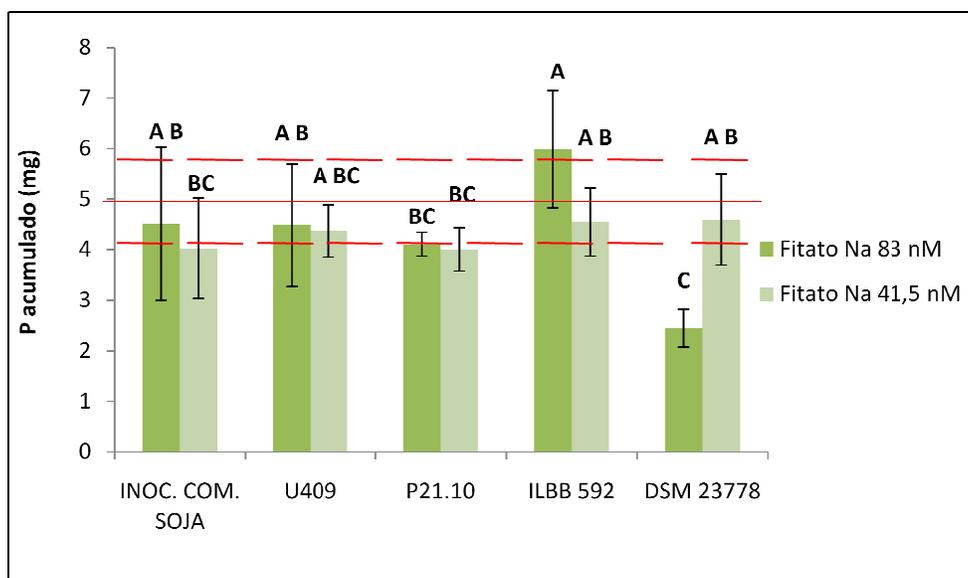


Figura 16. P acumulado en la parte aérea de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 y con *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409 o *S. chartreusis* P21.10 o *B. megaterium* ILBB 592 o *B. subtilis* DSM 23778, o únicamente inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (INOC. COM. SOJA). Las barras verde oscuro representan la condición de P orgánico en forma de fitato de sodio 83 nM, y las barras verde claro representan la condición de P orgánico en forma de fitato de sodio 41,5 nM. Los valores (barras del gráfico) corresponden a la media de 6 repeticiones \pm DE (líneas verticales). Los tratamientos con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). Se utilizó la prueba de comparación múltiple de medias, Test de Tukey ($\alpha = 0,05$). Análisis de la varianza en ANEXO IV. El número de nódulos se transformó logarítmicamente. La línea roja horizontal entera corresponde a la media de 6 repeticiones del control externo, plantas de soja inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 cultivadas en P inorgánico no limitante (KH_2PO_4), \pm DE (líneas rojas horizontales punteadas).

4.4. FITASAS RIZOBIANAS EN LA SIMBIOSIS SOJA-*Bradyrhizobium elkanii*

Con el fin de evaluar si las fitasas rizobianas de la simbiosis soja-*B. elkanii* eran las responsables de la adaptación de la simbiosis a la deficiencia de P es que se estudio la mineralización de fitato de sodio en medio líquido a dos pHs diferentes (6 y 7) por parte de ambas cepas de *B. elkanii* U1301 y U1302, la expresión de las mismas *in vitro* e *in situ* en nódulos de soja, y su efecto en parámetros de rendimiento, como peso seco parte aérea, de nódulos y de raíz, y número de nódulos, y en el P acumulado.

4.4.1. Mineralización de fósforo en medio líquido por *Bradyrhizobium elkanii* U1301 y U1302

Debido a que previamente al inocular las cepas *B. elkanii* U1301 y U1302 en medio Angle modificado suplementado con fitato de sodio a pH 7 no se observó que las mismas fueran capaces de mineralizar el fitato (Tabla 6) se continuó evaluando si las mismas eran capaces de mineralizar esta fuente de Po a otro pH. Para esto, primero, se realizaron curvas de crecimiento de estas cepas en medio líquido Angle modificado suplementado con fitato de sodio o con KH_2PO_4 a pH 6 o 7 (Figura 17).

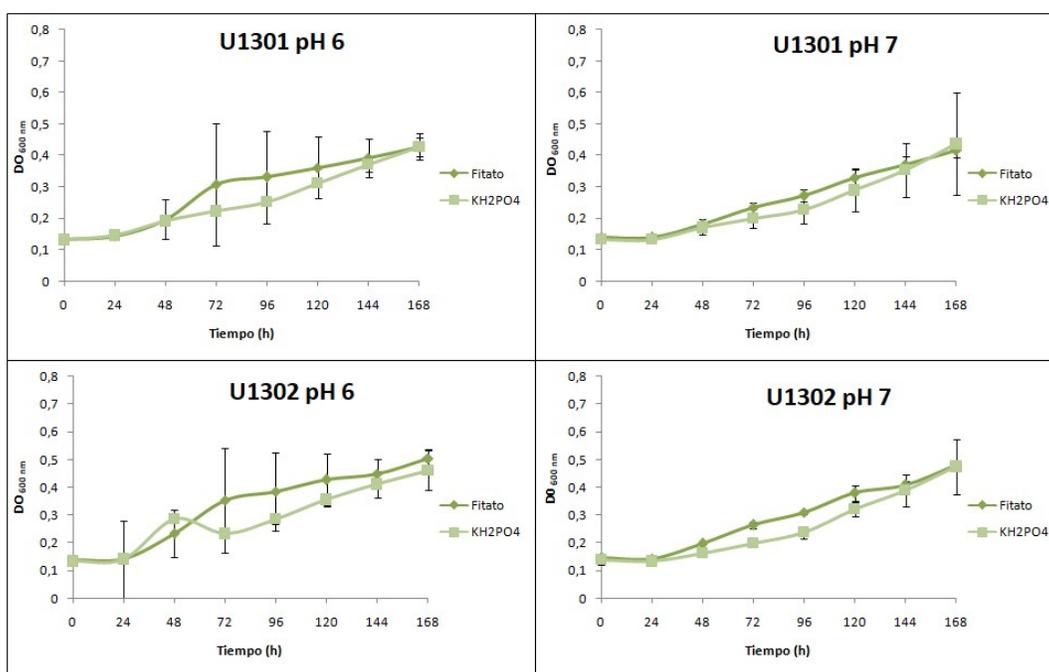


Figura 17. Crecimiento de las cepas *B. elkanii* U1301 y U1302 en función del tiempo en medio líquido Angle modificado, pH 6 o 7, suplementado con fitato de sodio (líneas verdes oscuras) o KH_2PO_4 (líneas verde claro), determinado mediante la DO a una λ de 600 nm. Los valores (puntos del gráfico) corresponden a la media de 3 repeticiones \pm DE (líneas verticales).

Las dos cepas de *B. elkanii* estudiadas presentaron curvas de crecimiento similares en medio líquido Angle modificado suplementado con fitato de sodio y suplementado con KH_2PO_4 a pH 6 y 7 (Figura 17). Esto indica que ambas cepas son capaces de crecer en las condiciones evaluadas.

Al cuantificar la capacidad de ambas cepas de mineralizar fitato de sodio en medio líquido Angle modificado a pH 6 y 7, cuantificando el P liberado al medio de cultivo, se observó que ambas cepas fueron capaces de liberar P al medio de cultivo debido a la mineralización del fitato de sodio presente en el mismo, a pH 6 (Figura 18). Sin embargo, sucede lo contrario a pH 7 (Figura 18). A su vez, se observa que la cepa U1302 presenta una mayor actividad mineralizadora de fitato de sodio que la cepa U1301 (Figura 18).

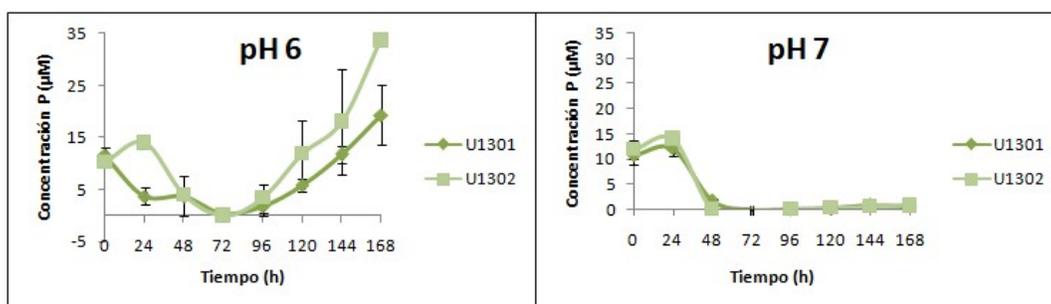


Figura 18. Actividad mineralizadora de fitato de sodio de las cepas *B. elkanii* U1301 (líneas verde oscuro) y U1302 (líneas verde claro) en función del tiempo, expresada como P liberado al medio de cultivo. Los valores (puntos del gráfico) corresponden a la media de 3 repeticiones \pm DE (líneas verticales).

4.4.2. RT-PCR *in vitro* de fitasas rizobianas

Con el fin de evaluar qué genes de fitasa expresan las cepas de *B. elkanii* U1301 y U1302, al crecer en fitato de sodio, se realizaron RT-PCRs *in vitro* utilizando *primers* para dos fitasas diferentes, HAP (fitasa con pH óptimo 5,5) y BPP (fitasa con pH óptimo entre 7 y 8). En la Figura 19 se muestra el perfil electroforético obtenido para una PCR realizada a partir del ADNc, obtenido mediante una RT del ARN extraído a partir de ambas cepas crecidas en medio sólido Angle modificado suplementado con fitato de sodio, y del ADNg de ambas cepas crecidas en estas mismas condiciones. En esta PCR, a su vez, se evaluó la utilización de BSA en la *mix* de reacción.

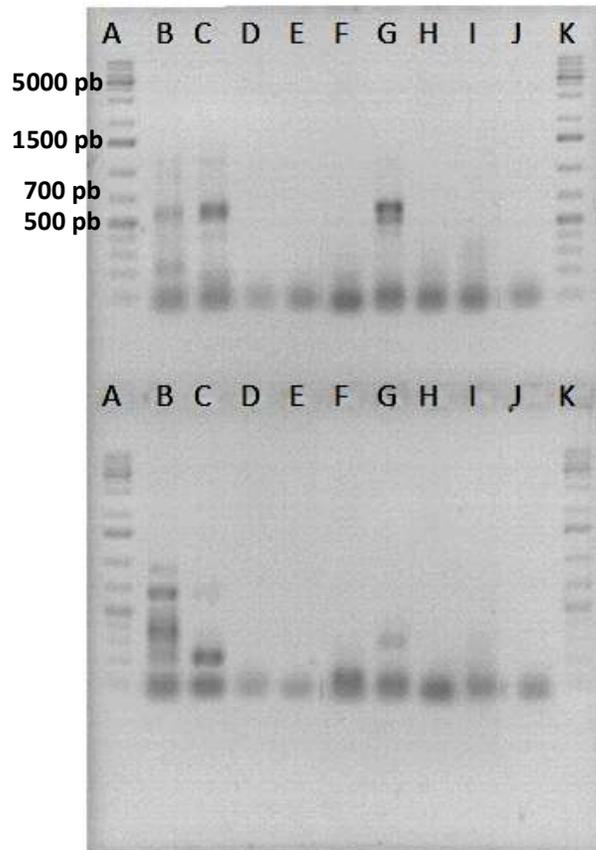


Figura 19. Perfil electroforético de los productos de amplificación obtenidos a partir del ADNc (arriba) y ADNg (debajo) de las cepas *B. elkanii* U1301 y U1302, utilizando *primers* para HAP y BPP. Carriles: **A y K**, MPM *GeneRuler* 1 Kb *Plus* (Thermo Fisher Scientific); **B**, U1301 HAP con BSA; **C**, U1301 HAP sin BSA; **D**, U1301 BPP con BSA; **E**, U1301 BPP sin BSA; **F**, U1302 HAP con BSA; **G**, U1302 HAP sin BSA; **H**, U1302 BPP con BSA; **I**, U1302 BPP sin BSA; **J**, control negativo.

Se obtuvieron productos de amplificación de aproximadamente 600 pb al amplificar el ADNc de ambas cepas utilizando el *primer* para HAP (Figura 19). En el caso de la cepa U1301, se obtuvo un producto de amplificación con y sin BSA, y en el caso de la cepa U1302, solamente se logró obtener un producto de amplificación sin BSA (Figura 19). Por lo que en las siguientes PCRs *in situ* realizadas, no se utilizó BSA. Al amplificar el ADNg de ambas cepas con el *primer* para HAP, sin BSA, se obtuvieron productos de amplificación de entre 300-200 pb para ambas (Figura 19), probablemente debido a que los *primers* se unieron inespecíficamente a otras regiones del genoma. Cabe destacar que no se logró encontrar una temperatura de hibridación a la cual estos *primers* con *mismatched* bases no amplificaran ADNg, sin embargo,

como se mostrará más adelante estos amplicones obtenidos a partir del ADNg a la temperatura de hibridación utilizada (62°C) fue despreciable a la hora de realizar las RT-PCRs *in situ*. Cuando se amplificó el ADNg de la cepa U1301 con el *primer* para HAP con BSA, se obtuvieron una mayor cantidad de productos de amplificación de diferentes tamaños (Figura 19), razón adicional para no utilizar esta proteína en las PCRs *in situ* realizadas. A su vez, cabe destacar que no se obtuvo ningún producto de amplificación al utilizar el *primer* para BPP para ninguna de las dos cepas, ya sea utilizando ADNc o ADNg (Figura 19). Lo cual indica que las fitasas que expresan estas cepas de *B. elkanii* en presencia de fitato de sodio son del tipo HAP y no del tipo BPP.

4.4.3. Cultivo hidroaerónico de soja-*Bradyrhizobium elkanii* U1301 o U1302

Los cultivares de soja N5909 y SR532, inoculadas con las cepas de *B. elkanii* U1301 y U1302, por separado, fueron cultivados en hidroaerponía, en condiciones de Psuf (250 $\mu\text{mol P.planta}^{-1}$) y Pdef (75 $\mu\text{mol P.planta}^{-1}$). Cabe destacar que las plantas de soja de ambos cultivares inoculadas con la cepa U1302 presentaron síntomas de deficiencia de N, ya que sus hojas presentaron un color amarillento, por lo que no se desarrollaron correctamente y no se pudo continuar trabajando con las mismas. Las plantas inoculadas con la cepa U1301, se cosecharon 42 días después de la transferencia, y se midió peso seco de parte aérea, de raíz y de nódulos, y el número de nódulos (Figura 20).

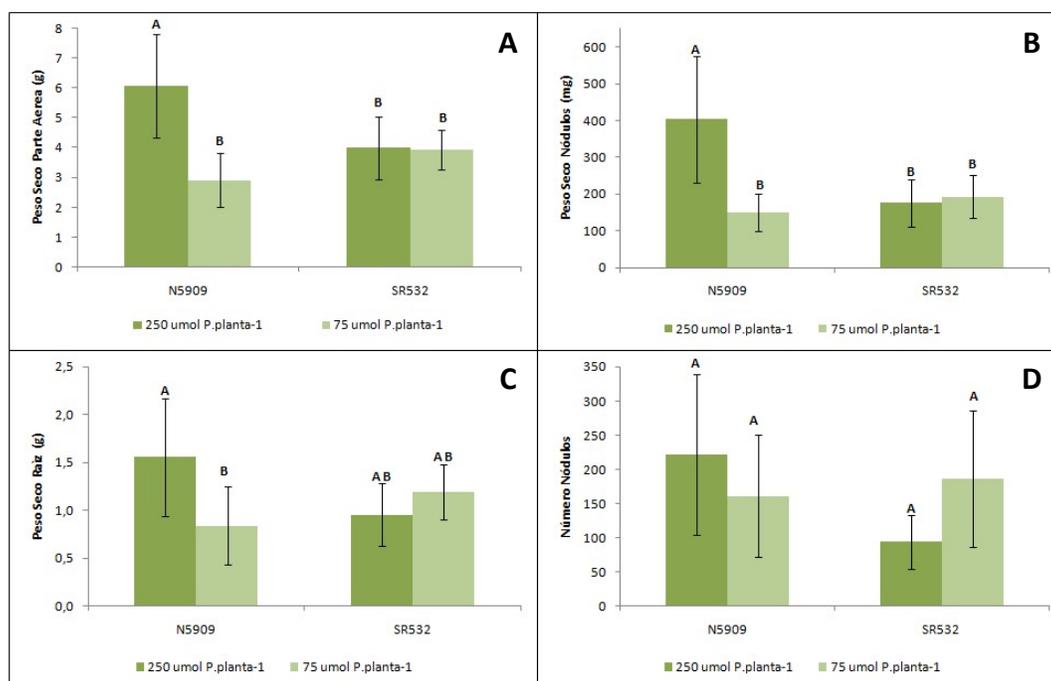


Figura 20. A, peso seco de parte aérea; B, peso seco de nódulos; C, peso seco de raíz; D, número de nódulos, de los cultivares de soja N5909 y SR532 inoculados con *B. elkanii* U1301 cultivados bajo Psuf (250 μmol P.planta⁻¹) (barras verde oscuro) y Pdef (75 μmol P.planta⁻¹) (barras verde claro). Los valores (barras del gráfico) corresponden a la media de 10 repeticiones ± DE (líneas verticales). Los tratamientos con una letra en común no son significativamente diferentes (p>0.05). Se utilizó la prueba de comparación múltiple de medias, Test de Tukey (α=0,05). Análisis de la varianza en ANEXO IV. El número de nódulos se transformó logaritmicamente.

Como se observa en la Figura 20, se encontró que en el caso del cultivar SR532, para todos los parámetros medidos, no hubo diferencias significativas entre la condición de Psuf y Pdef (ANEXO IV). Las plantas de este cultivar crecidas en ambas condiciones de P presentaron valores similares de peso seco de parte aérea, de nódulos, de raíz y número de nódulos (Figura 20). No sucedió lo mismo en el caso del cultivar N5909, que presentó significativamente (p<0,05) mayores valores de peso seco de parte aérea, de nódulos y de raíz en la condición de Psuf que en la condición Pdef (ANEXO IV). Cabe destacar que existió una interacción entre los factores condición de P y cultivar para las variables de peso seco parte aérea, de nódulos y raíz (p-valor= 0,0051, p-valor= 0,0054, p-valor= 0,019, respectivamente) (ANEXO IV). A su vez, cabe

destacar, que el número de nódulos, no fue un buen parámetro para evidenciar diferencias significativas entre tratamientos.

También se realizó la cuantificación de P acumulado en parte aérea de plantas de soja inoculadas con la cepa *B. elkanii* U1301, resultados que se muestran en la Figura 21.

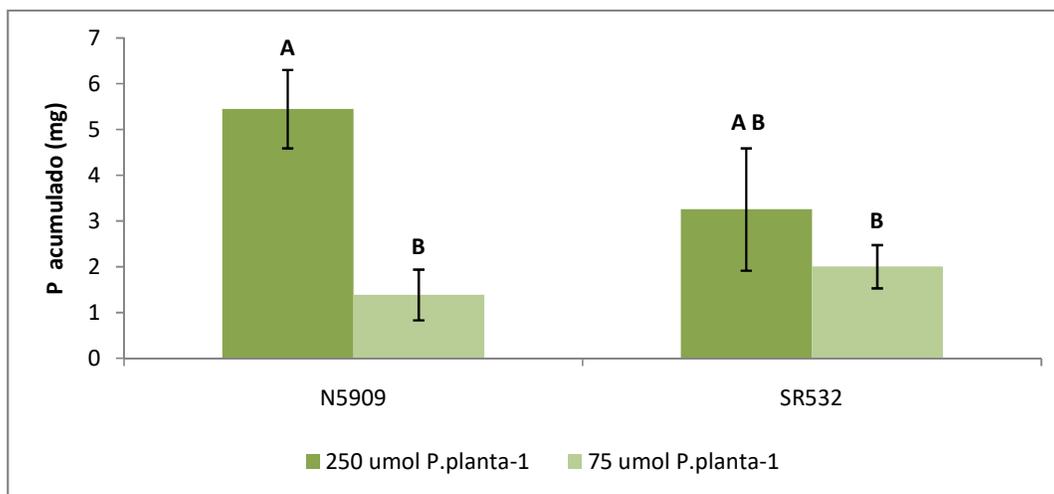


Figura 21. P acumulado en parte aérea de plantas de cultivares de soja N5909 y SR532 inoculadas con *B. elkanii* U1301. Las barras verde oscuro representan la condición de Psuf ($250 \mu\text{mol P.planta}^{-1}$) y las barras verde claro representan la condición de Pdef ($75 \mu\text{mol P.planta}^{-1}$). Los valores (barras del gráfico) corresponden a la media de 10 repeticiones \pm DE (líneas verticales). Los tratamientos con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). Se utilizó la prueba de comparación múltiple de medias, Test de Tukey ($\alpha = 0.05$). Análisis de la varianza en ANEXO IV. El número de nódulos se transformó logarítmicamente.

Los resultados obtenidos al cuantificar el P acumulado en ambos cultivares inoculados con *B. elkanii* U1301, coinciden con los resultados obtenidos al medir el peso seco de parte aérea, de nódulos y de raíz. Ya que, el cultivar N5909 cultivado en condición de Psuf acumuló significativamente ($p < 0.05$) una mayor cantidad de P, y el que presentó significativamente mayores pesos secos ($p < 0.05$), si se compara con este mismo cultivar bajo condición de Pdef, ya que acumuló una menor cantidad de P, y presentó menores pesos secos (Figuras 20 y 21) (ANEXO IV). A su vez, no hubo diferencias significativas entre el cultivar SR532 cultivado en condición de Psuf y Pdef (ANEXO IV), coincidiendo con los resultados obtenidos para los pesos secos (Figuras 20 y 21). Para esta variable también hubo una interacción entre los factores condición de P y cultivar ($p\text{-valor} = 0.023$) (ANEXO IV).

4.4.4. RT-PCR *in situ* de transcritos HAP rizobianos en nódulos de soja

Con el fin de estudiar si la expresión de las fitasas de tipo HAP rizobianas en los nódulos eran las responsables de la adaptación de la simbiosis a la deficiencia de P, se realizaron RT-PCRs *in situ* en los nódulos de cada tratamiento. En la Figura 22 se muestran algunas de las imágenes obtenidas de la expresión de los transcritos HAP rizobianos, y en la Figura 23 la intensidad de la señal fluorescente emitida por los transcritos HAP rizobianos en las secciones nodulares de cada tratamiento.

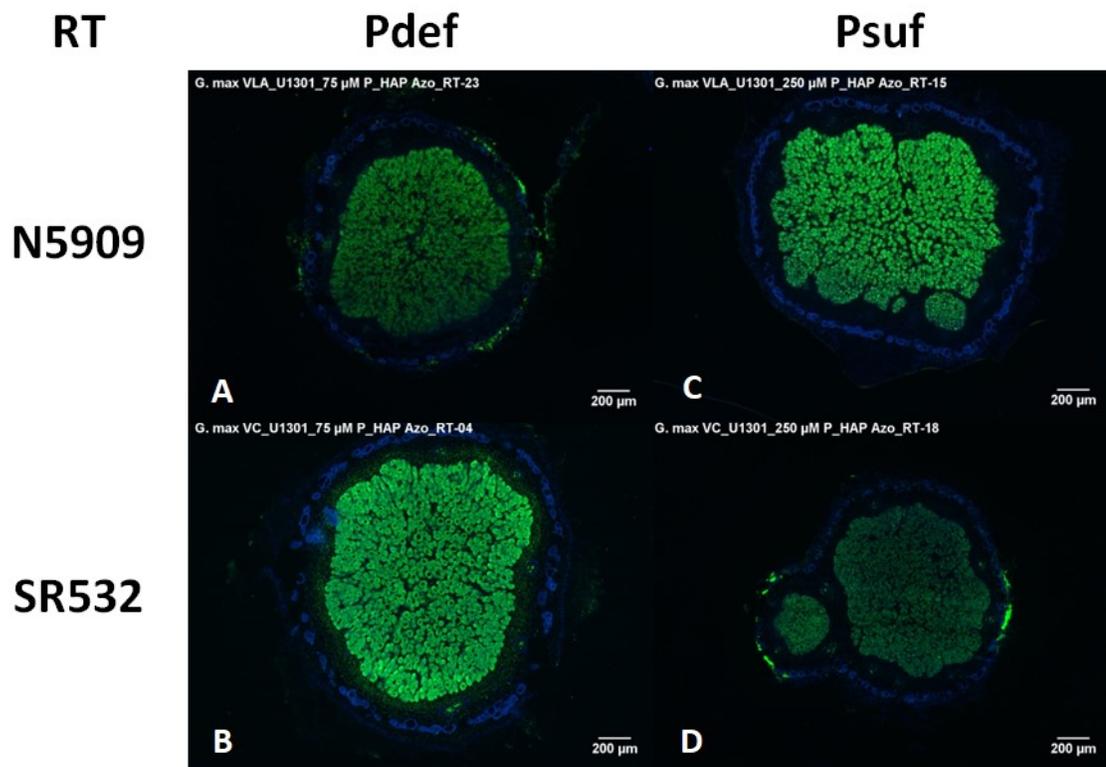


Figura 22. Localización *in situ* de transcritos HAP rizobianos (señal verde) en secciones nodulares de soja N5909 y SR532 inoculados con *B. elkanii* U1301 en condiciones de Pdef (75 $\mu\text{mol P.planta}^{-1}$): **A**, N5909; **B**, SR532; y en condiciones de Psuf (250 $\mu\text{mol P.planta}^{-1}$): **C**, N5909; **D**, SR532. Tiempo de exposición: DAPI: 350 ms, ELF: 500 ms. Aumento: 5X.

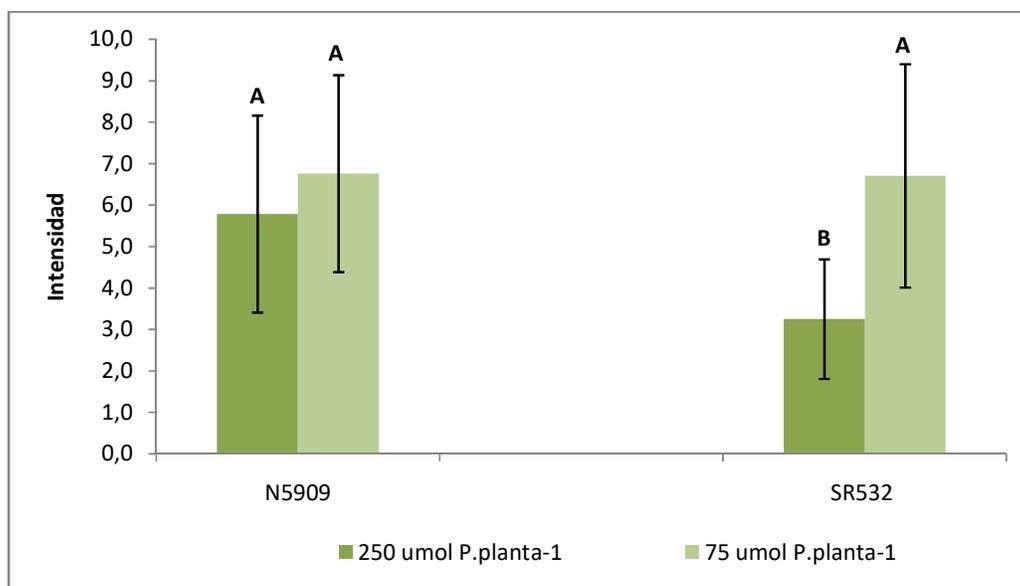


Figura 23. Intensidad de la señal fluorescente emitida por los transcritos HAP rizobianos en sección nodulares de cultivares de soja N5909 y SR532 inoculados con *B. elkanii* U1301, en condiciones de Psuf ($250 \mu\text{mol P.planta}^{-1}$) (barras verde oscuro) y Pdef ($75 \mu\text{mol P.planta}^{-1}$) (barras verde claro). Tiempo de exposición: DAPI: 350 ms, ELF: 500 ms. El eje de las y debe ser multiplicado por 10^8 . Los valores (barras del gráfico) corresponden a la media de 72 repeticiones \pm DE (líneas verticales). Los tratamientos con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). Se utilizó la prueba de comparación múltiple de medias, Test de Tukey ($\alpha = 0.05$). Análisis de la varianza en ANEXO IV. El número de nódulos se transformó logaritmicamente.

Como se observa en la Figura 22, se amplificó y localizó los transcritos HAP rizobianos *in situ* en secciones nodulares de los cultivares de soja N5909 y SR532 inoculados con *B. elkanii* U1301 cultivados bajo Psuf y Pdef. A su vez, se observó que en el caso de los controles negativos, es decir secciones nodulares donde se procedió a realizar exactamente el mismo proceso pero no se les agregó la enzima transcriptasa reversa a la hora de realizar la retrotranscripción *in situ* (NRT), se observó una muy baja señal de fluorescencia, comparado con las secciones nodulares donde se utilizó la enzima transcriptasa reversa (RT) (Figura 24, Anexo V), indicando que este método es apropiado para cuantificar el nivel de transcritos fitasa de tipo HAP en células procariotas, como fue demostrado por Maougal y colaboradores (2014a), en el caso de los transcritos BPP expresados por *B. subtilis*, y por Lazali y colaboradores (2013), en el caso de transcritos fitasa eucariotas.

La expresión de transcritos HAP rizobianos en las secciones nodulares de las plantas de soja N5909 inoculadas con U1301 cultivadas en ambas condiciones de P, Psuf y Pdef, es similar, estos transcritos se expresan en todas las células bacteroidales del nódulo y con una alta tasa de expresión, ya que emitieron una alta fluorescencia (Figura 22 y 23). No hubo diferencias significativas, en cuanto a la intensidad de la señal fluorescente emitida por los transcritos, entre ambas condiciones de P (Figura 23) (ANEXO IV). Sin embargo, sucedió lo contrario en el caso del cultivar SR532 inoculado con esta misma cepa. En este caso si hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambas condiciones de P (Figura 23) (ANEXO IV). Los nódulos de plantas cultivadas en Pdef presentaron una mayor intensidad de la señal fluorescente emitida por los transcritos HAP rizobianos, que los nódulos de plantas cultivadas en Psuf (Figuras 22 y 23). Es decir, en condiciones de Pdef la expresión de transcritos de HAP rizobianos en nódulos de plantas de soja SR532 inoculada con U1301 se ve aumentada. Cabe destacar, que hubo una interacción entre los factores condición de P y cultivar para esta variable de intensidad de fluorescencia emitida por los transcritos HAP rizobianos ($p\text{-valor} = 5,82 \times 10^{-5}$) (ANEXO IV). La intensidad de la señal fluorescente emitida por los transcritos del cultivar SR532 bajo Pdef, alcanza los mismos niveles que la señal emitida por los transcritos del cultivar N5909 bajo Psuf y Pdef (Figura 23). Cabe destacar, que para el cultivar SR532 inoculado con U1301 y cultivado en ambas condiciones de P, los transcritos HAP rizobianos son expresados en todas las células bacteroidales del nódulo, como en el caso del cultivar N5909 inoculado con la misma cepa.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. CAPACIDAD DE SOLUBILIZACIÓN Y/O MINERALIZACIÓN DE FÓSFORO *in vitro*

De un total de 99 cepas evaluadas en medio sólido Angle modificado suplementado con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 45% de los rizobios, 33% de los *Streptomyces* y 50% de los *Bacillus* produjeron un halo de solubilización. Sin embargo, ninguna fue capaz de producir un halo de solubilización cuando el medio se suplementó con FePO_4 o AlPO_4 . Estos resultados coinciden con la literatura que reporta que la mayoría de los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF) solubilizan compuestos fosfatados-Ca, y sólo unos pocos pueden solubilizar los compuestos fosfatados-Fe y -Al (Kucey *et al.*, 1989; Banik & Dey, 1982). Esto se debe a que la mayoría de los compuestos fosfatados-Fe y -Al son menos solubles en agua que el $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Bashan *et al.*, 2013). Park y colaboradores (2010) plantean que la baja solubilización de FePO_4 y AlPO_4 y la alta solubilización de los compuestos fosfatados-Ca puede ser explicada debido a su baja y alta solubilidad a pHs ácidos, respectivamente. Bashan y colaboradores (2013) plantean que en muchos casos existen BSF potenciales que crecen en medios suplementados con compuestos fosfatados insolubles pero que no son capaces de producir halos de solubilización visibles, y afirman que el halo de solubilización como único indicador de solubilización de P, se encuentra altamente sobreestimado. En este trabajo, se encontraron varias cepas de rizobios, *Streptomyces* y *Bacillus* capaces de crecer en medio sólido Angle modificado suplementado con AlPO_4 y/o en este mismo medio suplementado con FePO_4 . Por lo que, de acuerdo a lo planteado por Bashan y colaboradores (2013), podría resultar que las mismas sean solubilizadoras de estos compuestos, pero no produzcan halo de solubilización. El AlPO_4 es consideradamente más soluble que el FePO_4 (revisado por Bashan *et al.*, 2013), consistentemente con los resultados obtenidos, donde se observó que una mayor cantidad de cepas crecían en medio sólido Angle modificado suplementado con AlPO_4 comparado con el mismo medio suplementado con FePO_4 . A su vez, Alikhani y colaboradores (2006) observaron que la solubilización de fosfato en medio sólido se veía altamente afectada por la fuente de C utilizada, y que generalmente los halos de solubilización de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ de mayor tamaño se obtuvieron en los medios de cultivo donde se utilizó glucosa como fuente de C. Puede deberse a esto que en este trabajo se hallaron numerosas cepas solubilizadoras de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, ya que en este caso se utilizó un medio de cultivo donde la fuente de C consistía en glucosa, favoreciéndose, así, la producción de ácidos orgánicos. Por estas razones, Bashan y

colaboradores (2013) plantean que el $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ como factor de selección universal para aislar y evaluar bacterias solubilizadoras de fósforo (BSF) que aumenten el crecimiento vegetal no sería muy confiable. Una buena aproximación, es utilizar la combinación de dos o tres compuestos fosfatados metálicos juntos o en tándem para la selección de BSF (Bashan *et al.*, 2013). Las 99 cepas fueron evaluadas en medio sólido suplementado con fitato de sodio, el 20% de los rizobios, el 28% de los *Streptomyces* y el 40% de los *Bacillus* produjeron halo de mineralización. El hecho de que la proporción de cepas con capacidad de movilizar P a partir de compuestos inorgánicos sea mayor que la capacidad de movilizar P a partir de compuestos orgánicos puede deberse, a que las cepas mineralizadoras de fitato deben producir fitasas y, a su vez, ser incubadas en el pH óptimo de la enzima. En este trabajo, se utilizó el medio sólido Angle modificado suplementado con fitato de sodio pH 7, dentro del rango de pH óptimo para las fitasas del tipo Beta-propeller (BPP), entre 7 y 8 (Oh *et al.*, 2004). Por otro lado, una de cada cuatro de las cepas de rizobios evaluadas produjeran un halo de mineralización, algo escasamente señalado en la literatura. Solamente se encontró un reporte de rizobios con potencial de mineralización (Alikhani *et al.*, 2006), quienes encontraron que 76% de las cepas rizobianas producían halo en medio sólido con fitato. Hasta la fecha en bases de datos como el NCBI y Swiss-Prot no se han depositado secuencias de ningún tipo de fitasas de origen rizobiano (Jorquera *et al.*, 2008; actualizado para la presente tesis). Sí es frecuente el reporte de otros géneros con potencial de mineralizar P, dentro de los cuales uno de los géneros más reportados y estudiados es *Bacillus* (Kumar *et al.*, 2013, 2012; Jorquera *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2009; Hill *et al.*, 2007). A su vez, cabe destacar que la literatura donde se estudia la mineralización de fitato u otras fuentes de Po por parte de bacterias, es relativamente escasa si se compara con la literatura existente sobre la solubilización de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

En la siguiente etapa de evaluación de la capacidad de liberar P en medio líquido suplementado con fitato de sodio, las cepas rizobianas fueron las que presentaron una mayor capacidad. Este resultado contrasta con la mayoría de los estudios para identificar bacterias mineralizadoras de fitato, donde las especies de *Bacillus* fueron las más destacadas (Maougal *et al.*, 2014). En el presente estudio, la cepa *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409 fue la que liberó más P (47,99 ppm a las 144 h de incubación y 42,13 ppm a las 336 h de incubación). Al comparar el P liberado a las 144 y 336 h, el ordenamiento (*ranking*) de las cepas de rizobios y de *Streptomyces* se mantiene, mientras que los *Bacillus* que mineralizaron más fitato a las 144 h, fueron las que menos mineralizaron a las 336 h. Esto podría deberse a la diferencia en la duración de las fases lag de los distintos organismos. La actividad de las fitasas extracelulares

aparecen luego del agotamiento de las fuentes de P de fácil acceso (Idriss *et al.*, 2002). Maougal y colaboradores (2014b), obtuvieron fases lag de liberación de P en medio líquido entre 25 y 70 h, Patel y colaboradores (2010) obtuvieron fases lag de 30 h. Además, cabe destacar, que las tres cepas de *Bacillus* evaluadas movilizaron mayor cantidad de P a las 144 h que la cepa control positivo utilizada, *B. subtilis* DSM23778. Las cantidades de P liberado reportadas en los diferentes trabajos son muy dispares, pudiendo deberse a la utilización de distintos medios, a las diferentes condiciones y tiempos de incubación, y a los distintos métodos utilizados para cuantificar el P liberado (Unno *et al.*, 2005; Jorquera *et al.*, 2008b; Oliveira *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2015). Si bien las cepas P27.1, P27.2, P27.6, P27.13, S. P30.1 y P30.10 produjeron un halo en medio sólido, no movilizaron P en medio líquido durante todo el período de incubación. Coincidentemente, Maougal y colaboradores (2014b) utilizando el medio Angle modificado para aislar bacterias capaces de mineralizar fitato a partir de suelo rizosférico de poroto (*P. vulgaris*) encontraron que sólo 26 aislamientos fueron capaces de movilizar el P en medio líquido, de 57 aislamientos que habían formado un halo en medio sólido. Esto confirma que las bacterias que produzcan un halo de mineralización en medio sólido con fitato como fuente de P no son necesariamente mineralizadoras de fitato. En realidad, el halo de mineralización puede deberse a la solubilización del fitato de calcio, dado que el fitato de sodio precipita al intercambiarse el Na^+ por el Ca^{2+} presente en el medio de cultivo, en forma de CaSO_4 , y si la cepa es capaz de producir ácidos orgánicos que quelan el Ca^{2+} , el fitato de calcio se solubiliza, por lo que se observaría el halo de mineralización, pero no ocurriría efectivamente la mineralización del mismo (Maougal *et al.*, 2014b). La unión del fitato a las fitasas implica la interacción de seis grupos fosfato desprotonados del anillo del inositol con las cadenas laterales de varios residuos aminoácidos básicos de la enzima (Patel *et al.*, 2010), por lo que si el fitato se encuentra unido al Ca^{2+} , no es posible que el mismo interactúe con el sitio activo de las fitasas. Confirmando lo propuesto por Maougal y colaboradores (2014b), las cepas P27.2, P27.6, P27.13, P30.1 y P30.10 disminuyeron el pH del medio de cultivo líquido entre 6,55 y 4,81, por lo que probablemente las mismas producirían ácidos orgánicos quelantes de Ca^{2+} , solubilizando el fitato, y produciendo halos de mineralización en medio sólido, pero no movilizando P en medio líquido. Patel y colaboradores (2010), encontraron que las cepas que no producían ácidos orgánicos no eran capaces de liberar el P a partir del fitato de calcio. Sin embargo, la cepa *B. megaterium* ILBB 592 no acidificó el medio de cultivo líquido, pero liberó altas concentraciones de P al medio suplementado con fitato de sodio como fuente de P. Yu y colaboradores (2012), encontraron lo mismo al co-inocular medio líquido PKV suplementado con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ con una BSF, *B. megaterium*, y una bacteria

fijadora de N, *Azospirillum pascens*, estas bacterias liberaron altas concentraciones de P al medio pero no lo acidificaron. Esto puede ser debido a que son capaces de liberar otros productos que no sean ácidos orgánicos, como los exopolisacáridos o sustancias quelantes de Fe^{3+} , Al^{3+} , Ca^{2+} y Mg^{2+} , resultando en la solubilización de los compuestos fosfatados-Ca (Yu *et al.*, 2012; Yi *et al.*, 2008).

5.2. EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE CEPAS MINERALIZADORAS DE FITATO EN LA SIMBIOSIS SOJA-RIZOBIO

En los ensayos de promoción de crecimiento vegetal y/o de absorción de P, se encontró que la cepa *B. megaterium* ILBB 592 inoculada en las plantas de soja cultivadas en solución nutritiva con Po en forma de fitato de sodio 83 nM aumentó significativamente en un 49% el P acumulado en la parte aérea con respecto a las plantas solamente inoculadas con el inoculante comercial cultivadas en fitato de sodio 41,5 nM. A su vez, aumentó en un 33% el P acumulado en la parte aérea con respecto a las plantas solamente inoculadas con el inoculante comercial cultivadas en fitato de sodio 83 nM, y en un 21% con respecto a las plantas control externo, es decir cultivadas en solución nutritiva con P inorgánico no limitante (KH_2PO_4), aunque estas dos últimas no hayan sido significativamente diferentes (ANEXO IV). Si bien las diferencias no fueron significativamente diferentes, un incremento en un 33% podría resultar beneficioso en términos de rendimiento para el cultivo, por lo que sería interesante continuar con la evaluación de esta cepa en condiciones diferentes. Bashan y colaboradores (2013) plantean que una vez realizados todos los ensayos *in vitro* anteriormente planteados para determinar si una bacteria es mineralizadora (o solubilizadora) de fosfato, la misma debe ser evaluada de acuerdo a su directa contribución a la nutrición fosfatada de la planta y no necesariamente evaluar únicamente la promoción de crecimiento vegetal más general, como la cantidad de biomasa, debido a que esta promoción del crecimiento vegetal puede no encontrarse directamente relacionada a la mineralización (o solubilización) de fosfato sino a otros mecanismos de promoción de crecimiento vegetal. Finalmente, si la cepa fue capaz de contribuir a la nutrición fosfatada de la planta, se puede afirmar que es capaz de mineralizar (o solubilizar) fosfato. En este caso la cepa ILBB 592 contribuyó a la nutrición fosfatada de la planta, por lo que se podría afirmar que es una bacteria mineralizadora de fosfato. Ramírez y Klopper (2010), estudiaron el efecto en la promoción del crecimiento vegetal y en la nutrición fosfatada de la inoculación de una cepa mineralizadora de fitato, *B. amyloliquefaciens* FZB45, en plantas de col china (*Brassica rapa*) cultivadas en P inorgánico no limitante y dos niveles de

fitato, hallando que esta cepa solamente promovía el crecimiento vegetal y la absorción de P en la condición de mayor concentración de fitato, confirmando que la actividad fitasa es el mecanismo principal de acción de esta cepa y que se encuentra limitada por la disponibilidad de fitato en el suelo. El suelo modula el rendimiento de las bacterias PGPRs en una manera específica, consistente a los mecanismos de acción involucrados. La determinación de esos mecanismos y sus factores de modulación ayudan a predecir las condiciones donde la promoción de crecimiento vegetal va a ser exitosa, un paso importante para aumentar el éxito de las PGPRs (Ramírez & Kloepper, 2010). Los mismos resultados se han encontrado en esta tesis, por lo que se podría suponer que la capacidad de mineralizar fitato de la cepa *B. megaterium* ILBB 592 sería el mecanismo responsable de aumentar la nutrición fosfatada en plantas de soja cultivados en suelos con alto contenido de Po, como lo son los suelos de nuestro país (Hernández *et al.*, 1995), y esta actividad se encontraría limitada por la disponibilidad de fitato en los mismos. En los años 1950s, agricultores de la Unión Soviética y de otros países de Europa del este fertilizaban los suelos agrícolas con un fertilizante que consistía en caolinita impregnada con esporas de *B. megaterium* var. *phosphaticum*, el cual aumentaba la tasa de mineralización de Po en el suelo, resultando en un aumento de la biodisponibilidad del P del suelo para las plantas, aumentando el crecimiento vegetal y el rendimiento (Kucey *et al.*, 1989). Los cultivos de hortalizas respondían mejor a la inoculación, sin embargo, se encontró que granos y papas (*Solanum tuberosum*) también respondían a la inoculación con este fertilizante. Los suelos que respondían mejor a esta inoculación eran los suelos neutros-alcalinos con altas concentraciones de Po. Ensayos llevados a cabo en los Estados Unidos, no mostraron resultados positivos, sin embargo, los ensayos llevados a cabo en la India si lo fueron (Kucey *et al.*, 1989), lo cual confirma que el tipo suelo influye en el rendimiento de las bacterias PGPRs y es un factor a considerar a la hora de inocular.

A su vez, existen una gran cantidad de trabajos previos que han demostrado que los géneros *Paenibacillus* y *Bacillus*, se encuentran extensamente distribuidos en suelos agrícolas, y que muchas cepas de estos géneros tienen un alto potencial para ser utilizados como inoculantes agrícolas, con rasgos que incluyen, la fijación de N, solubilización y mineralización de fosfatos, producción de antibióticos y citoquininas, biofloculación y aumento de la porosidad del suelo (Lal & Tabacchioni, 2009; McSpadden Gardener, 2004). Uno de estos es el trabajo realizado por Ramesh y colaboradores (2014), los cuales encontraron que tres cepas de *B. aryabhatai*, solubilizadoras y mineralizadoras de fosfato, aumentaban los parámetros de crecimiento vegetal, el contenido de P y el rendimiento de soja y trigo, en condiciones de

microcosmos. A su vez, estos géneros son de particular interés como posibles inoculantes agrícolas ya que producen esporas tolerantes a condiciones severas, como por ejemplo, de desecación y altas temperaturas, y pueden sobrevivir mejor que las bacterias Gram-negativas durante la producción y el almacenaje de los mismos (Jorquera *et al.*, 2008b).

Contrariamente a lo que cabía esperar, la cepa control positivo, *B. subtilis* DSM 23778, fue la que presentó un menor P acumulado, con respecto a los controles y a los otros tratamientos inoculados con las cepas seleccionadas. En este trabajo se encontraron cepas con un mayor rendimiento a la hora de aumentar la absorción de P de plantas de soja que la cepa utilizada por Maougal y colaboradores (2014b) en ensayos anteriores. Estos autores encontraron que la co-inoculación con la cepa *B. subtilis* DSM 23778 y con *R. tropici* CIAT 899, ambas a una concentración de 10^9 ufc.mL⁻¹, en plantas de poroto cultivadas en solución nutritiva suplementada con fitato, disminuyó la biomasa y número de nódulos, la biomasa de parte aérea y de raíz, y la acumulación de P, en comparación con las plantas de poroto solamente inoculadas con *R. tropici* CIAT 899 y cultivadas en solución nutritiva suplementada con P inorgánico no limitante (KH₂PO₄). Sin embargo, en esta tesis se encontró que la cepa *B. subtilis* DSM 23778 aumento, en promedio, la biomasa de parte aérea, nódulos y raíz, y el número de nódulos de las plantas de soja cultivadas en Po, con respecto a las plantas cultivadas en P inorgánico no limitante e inoculadas solamente con el inoculante comercial. Estas diferencias pueden deberse a que en esta tesis esta cepa fue inoculada en una concentración de 10^7 ufc.mL⁻¹, y en el trabajo de Maougal y colaboradores (2014b), la misma fue inoculada a una concentración de 10^9 ufc.mL⁻¹, compitiendo en los pelos radiculares con la *R. tropici* CIAT 899, colonizando intensamente esta zona, inhibiendo la nodulación, y la consecuente fijación de N (Maougal *et al.*, 2014b). Por lo que, la concentración utilizada en esta tesis parece no competir con los rizobios utilizados para inocular los cultivos de soja. A su vez, cabe destacar que previamente se realizaron ensayos de compatibilidad *in vitro* e *in vivo*, donde se observó que ninguna de las cepas utilizadas en los ensayos de promoción de crecimiento vegetal y/o de absorción de P inhibieron el crecimiento *in vitro* del inoculante comercial formulado ni el desarrollo nodular ni vegetal de las plantas de soja. Un resultado destacable de estos ensayos de compatibilidad *in vivo*, es la recuperación de adentro de los nódulos de soja de la cepa *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409, al ser co-inoculada en tres concentraciones, aunque cuantitativamente su presencia es muy baja. Fox y colaboradores (2011) mostraron que aproximadamente el 10% de los nódulos pueden estar ocupados por múltiples cepas rizobianas. Es posible que el co-inoculante, en este caso la cepa U409,

concurrentemente pueda colonizar un pelo radicular infectado durante el proceso de infección (Fox *et al.*, 2011).

Por otro lado, se encontró que, en promedio, las plantas de soja cultivadas en solución nutritiva con fitato de sodio, presentaron mayores peso secos de parte aérea y nódulos, y número de nódulos, que las plantas cultivadas en solución nutritiva con P inorgánico no limitante, y a su vez, no presentaron diferencias significativas en cuanto al P acumulado, lo cual podría ser explicado por la capacidad de esta especie vegetal de producir fitasas. Belinque y colaboradores (2015), demostraron que las plantas de soja son capaces de crecer, y por ende utilizar fuentes orgánicas de P, en solución nutritiva con diferentes fuentes de Po, entre ellas fitato. Estos autores hallaron una acumulación de P mayor, y en algunos casos un aumento de la biomasa total, en las plantas que se les suministraron fitato y glucosa 1-fosfato comparado con las plantas que no se les suministró P. Existen plantas, como la soja, que son capaces de utilizar el fitato con una eficiencia relativamente alta, mediante la hidrólisis enzimática de este sustrato. A su vez, estos autores inocularon estas plantas de soja con la cepa *B. amyloliquefaciens* BNM 340, que presentaba actividad fitasa *in vitro*, sin embargo no contribuyó a la adquisición de P por parte de las plantas de soja. Por lo que plantean, que probablemente la fitasa extracelular expresada por las raíces fue suficiente para satisfacer la demanda de P de la planta (Belinque *et al.*, 2015). Existen enzimas vegetales relacionadas con el metabolismo del P que son sobre-expresadas en nódulos de leguminosas, más específicamente en poroto, bajo condiciones de P deficiente, como la fosfoenol piruvato fosfatasa (Bargaz *et al.*, 2012) y las fitasas (Lazali *et al.*, 2013; Araujo *et al.*, 2008). Podría ocurrir que los rizobios noduladores de soja expresen fitasas, o alguna otra fosfatasa, bajo estas condiciones de P poco disponible. Estas enzimas vegetales y/o rizobianas son capaces de liberar iones ortofosfatos, a partir de compuestos fosfatados orgánicos presentes en los nódulos, necesario para la fijación biológica de N, ya que la misma requiere 16 ATPs por molécula de N₂ fijado, por lo que una sobre-expresión de las mismas aumentaría la fijación de N, produciendo más biomasa (Vadez & Drevo, 2001). Estas podrían ser las causas por la que no se observó un efecto sobre la promoción de crecimiento vegetal y el P acumulado al inocular las plantas de soja con las cepas *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409 y *S. chartreusis* P21.10.

5.3. FITASAS RIZOBIANAS EN LA SIMBIOSIS SOJA-*Bradyrhizobium elkanii*

Las leguminosas son capaces de expresar fitasas vegetales y/u otras fosfatasas en condiciones de P deficiente (Belinque *et al.*, 2015; Lazali *et al.*, 2013; Bargaz *et al.*, 2012; Araujo *et al.*, 2008), pero no existe información alguna en la literatura sobre la expresión de este tipo de enzimas rizobianas relacionadas con el metabolismo del P en condiciones de P deficiente en leguminosas. Debido a lo discutido en el párrafo anterior y a que el objetivo general de esta tesis es explorar la riqueza biológica en la colección nacional de rizobios, se estudió si la expresión de una enzima fitasa rizobiana en nódulos de soja era responsable de la adaptación de la soja a condiciones de P deficiente.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el medio sólido Angle modificado suplementado con fitato de sodio, las dos cepas rizobianas que conforman el inoculante comercial, *B. elkanii* U1301 y U1302, no producían halo de mineralización, por lo que no producirían fitasas. Pero este *screening* se realizó a pH 7, favoreciendo así la expresión de las enzimas que actúan a este pH óptimo, como son las BPPs, por lo que podría suceder que estas dos cepas rizobianas expresaran otro tipo de fitasas, que actuaran a pHs más ácidos, como las fitasas del tipo HAPs, cuyo pH óptimo se encuentre entre 5 y 6. Esto fue corroborado al cuantificar la capacidad de movilizar P en medio líquido Angle modificado suplementado con fitato de sodio a pH 6 y 7 de ambas cepas de *B. elkanii*, y al realizar las RT-PCR *in vitro* utilizando dos conjuntos de *primers* para dos tipos de fitasas, uno para las fitasas de tipo HAP y otro para las fitasas de tipo BPP, ya que ambas cepas solamente fueron capaces de movilizar P en medio líquido a pH 6 y únicamente se obtuvieron productos de amplificación al utilizar los *primers* para las HAP. Cabe destacar que este es el primer trabajo donde se evidencia que los rizobios, más específicamente la especie *B. elkanii*, son capaces de expresar fitasas de tipo HAP.

Se estudió la expresión de los transcriptos de esta HAP rizobiana en secciones nodulares de soja *in vivo* y su contribución a la adaptación a la deficiencia de P de la simbiosis soja-*B. elkanii*. En el caso del cultivar N5909 inoculado con U1301 hubo diferencias significativas entre las dos condiciones de P, Psuf y Pdef, en cuanto a los pesos secos de parte aérea, de nódulos y de raíz, número de nódulos y el contenido de P, obteniéndose menores valores de estos parámetros en la condición de Pdef. Sin embargo en el caso del cultivar SR532 inoculado con esta misma cepa, el tratamiento en condiciones de Pdef equiparó al mismo tratamiento en condiciones de Psuf en cuanto a parámetros de biomasa, número de nódulos y

P acumulado. Resultados similares se encontraron cuando se determinó la intensidad de la señal fluorescente emitida por los transcriptos HAP rizobianos en las secciones nodulares, ya que la intensidad de estos transcriptos emitida en el cultivar N5909 inoculado con *B. elkanii* U1301 bajo ambas condiciones de P no es significativamente diferente, sin embargo la intensidad de los transcriptos HAP expresados por la cepa *B. elkanii* U1301 en el cultivar SR532 en condiciones de P_{def} es significativamente mayor que la intensidad de estos mismos transcriptos en condiciones de P_{suf}. El alto nivel de expresión de esta fitasa de tipo HAP rizobiana en nódulos del cultivar SR532 bajo P_{def} sugiere que esta enzima contribuye a la adaptación de este cultivar en suelos con bajo P. HAP puede clasificarse como un gen inducible por falta de P, involucrado en la tolerancia del cultivar SR532 a la deficiencia de P. Esta alta tolerancia de este cultivar a la deficiencia de P, comparada con el cultivar N5909, se encuentra asociada a una mejor capacidad de mantener la fijación de N₂ bajo un suministro deficiente de P. Relacionado con la capacidad de aumentar la expresión de fitasas HAP rizobianas en estas condiciones, que mineralizaran el fitato presente en los nódulos, como reserva de fosfatos, aumentando la concentración de iones ortofosfato en los mismos para que ocurra la fijación biológica de N₂ (Lazali *et al.*, 2013) en forma de amonio en las células bacteroidales, y posteriormente asimilado en forma de aminoácidos y ureidos en las células vegetales, procesos que también necesitan de energía en forma de ATP (Araujo *et al.*, 2008). La expresión de estos transcriptos de HAP rizobiana ocurre en todas las células bacteroidales de la zona de infección del nódulo. El alto nivel de transcriptos en esta zona es consistente con el alto requerimiento de P para un óptimo metabolismo, una buena multiplicación y supervivencia de los bacteroides (Bargaz *et al.*, 2012).

Contrariamente a lo que sucede con las fitasas vegetales, que en todos los genotipos de poroto evaluados por Lazali y colaboradores (2013) y Araujo y colaboradores (2008) la expresión y la actividad de las mismas aumenta en condiciones de P_{def}, es decir el genotipo vegetal no influye la expresión y actividad de la fitasas vegetales, en el caso de las fitasas de tipo HAP rizobianas, el genotipo vegetal si influye su nivel de expresión, ya que un genotipo aumenta su nivel de expresión en condiciones de P_{def} y el otro no. Sin embargo, una mayor cantidad de estudios sobre la expresión de estas fitasas HAP rizobianas en una mayor cantidad de genotipos de soja en condiciones limitantes de P, son necesarios para corroborar esta hipótesis. A su vez, sería interesante, en un futuro, realizar estos mismos ensayos en cultivares de soja co-inoculadas con ambas cepas conformantes del inoculante comercial para evaluar su efecto sinérgico y la expresión en conjunto de los transcriptos HAPs por parte de ambas cepas.

Cabe destacar que este es el primer trabajo donde se evidencia y visualiza la expresión de un transcripto fitasa rizobiano en nódulos de leguminosas. El desarrollo de una metodología como esta, de RT-PCR *in situ*, proporciona una oportunidad interesante para vincular la localización y distribución de los genes candidatos dentro de diferentes órganos vegetales, en este caso los nódulos de una leguminosa fijadora de N₂. Además, la técnica permite cuantificar los efectos ambientales sobre la expresión génica de diferentes genes (Bargaz *et al.*, 2012), en este caso de una fitasa HAP rizobiana.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

A partir de 99 cepas de rizobios, *Streptomyces* y *Bacillus* pertenecientes a colecciones presentes en nuestro laboratorio, se encontraron tres cepas bacterianas, una de cada grupo bacteriano, con una alta capacidad de mineralizar fitato de sodio y solubilizar $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ *in vitro*: *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* U409, *S. chartreusis* P21.10 y *Bacillus megaterium* ILBB 592. En particular, la cepa *Bacillus megaterium* ILBB 592 aumentó significativamente el fósforo acumulado en la parte aérea de las plantas de soja inoculadas con esta cepa y el inoculante comercial para este cultivo y cultivadas en solución nutritiva Somasegaran y Hoben (1985) suplementada con fitato de sodio 83 nM al compararse con las plantas de soja inoculadas con el inoculante comercial cultivadas en esta misma solución nutritiva suplementada con fitato de sodio 41,5 nM. Convirtiéndose en una cepa candidata para desarrollar un producto microbiano con capacidad de aumentar la absorción de fósforo en soja. A partir de los resultados obtenidos en esta tesis de Maestría, se comenzó a utilizar esta cepa como control positivo en los ensayos realizados por la estudiante de Maestría en Biotecnología, Nadia Martin, y el estudiante de Doctorado en Ciencias Agrarias, Pablo Torres, en el marco del proyecto “Desarrollo de inoculantes para la movilización de fósforo como insumo en la producción agrícola”, los cuales confirmaron y obtuvieron resultados adicionales para considerarla como cepa candidato para el desarrollo de un futuro inoculante agrícola. Actualmente se encuentra en etapa de bioproducción y por comenzar a realizarse los ensayos a campo (Martin, comunicación personal, 2018; Torres, comunicación personal, 2018). A su vez, a partir de esta tesis de Maestría, se presentó un proyecto de investigación al fondo María Viñas-ANII, el cual fue aprobado, donde se propone estudiar la base genética y molecular de la actividad mineralizadora de fitato de las cepas rizobianas, debido a que no existe literatura sobre este tema.

Por otro lado, este es el primer trabajo donde se demuestra la capacidad mineralizadora de fósforo de las cepas rizobiana utilizadas en el inoculante comercial para el cultivo de soja en nuestro país (*Bradyrhizobium elkanii* U1301 y U1302), su capacidad de expresar fitasas del tipo HAP y el primer trabajo donde se visualizó la expresión *in situ* de estas fitasas en secciones nodulares de soja. Revalorizando estas dos cepas utilizadas comercialmente para el cultivo de soja. En particular, se encontró que la expresión nodular de una fitasa del tipo HAP rizobiana contribuye a la adaptación del cultivar SR532 en condiciones

de P deficiente, y que el material vegetal puede afectar el nivel de expresión de fitasas rizobianas en los nódulos de soja. Por lo que, es importante elegir correctamente el genotipo vegetal, conjuntamente al genotipo bacteriano, a la hora de cultivar soja en suelos con P limitante, y seleccionar los genotipos vegetales-bacterianos que se encuentran más adaptados a la deficiencia de P. Se propone considerar las actividades y la expresión de enzimas fitasas, vegetales y rizobianas, y de otras enzimas relacionadas con el metabolismo del fósforo a la hora de seleccionar la simbiosis soja-rizobio a utilizar en condiciones de fósforo deficiente. A su vez, sería interesante continuar estudiando los mecanismos de regulación de la expresión de esta enzima en los diferentes cultivares de soja.

Mediante estas dos aproximaciones evaluadas, ya sea inoculando una cepa bacteriana que aumente la absorción de fósforo por parte de las plantas o seleccionando los genotipos vegetales-bacterianos más adaptados a la deficiencia de fósforo, se evitaría un agregado de fertilizantes fosfatados excesivo en el cultivo de soja.

ANEXOS

ANEXO I-Resumen de microorganismos mineralizadores de fitato y promotores del crecimiento vegetal

Tabla 9. Ejemplos de microorganismos mineralizadores de fitato y promotores del crecimiento vegetal.

| Fuente de Fitasa | Promoción de Crecimiento Vegetal | Referencia |
|---|---|---|
| <i>Bacillus aryabhatai</i> | Soja (<i>Glycine max</i>) Trigo (<i>Triticum turgidum</i>) | Ramesh <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>Advenella sp.</i> <i>Cellulosimicrobium sp</i> | Mostaza de la India (<i>Brassica juncea</i>) | Singh <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>Citrobacter sp.</i> <i>Pantoea sp.</i> <i>Klesbiella sp.</i> | Guisante (<i>Cajanus cajan</i>) | Patel <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>Enterobacter sp.</i> | Guisante (<i>Cajanus cajan</i>) Tomate(<i>Solanum lycopersicum</i>) | Patel <i>et al.</i> , 2010 Harisprasad & Niranjana, 2009 |
| <i>Sporotrichum thermophile</i> | Trigo (<i>Triticum aestivum</i>) | Singh & Satyanarayana, 2010 |
| <i>Bacillus sp.</i> <i>Azotobacter sp.</i> <i>Serratia sp.</i> | Tomate(<i>Solanum lycopersicum</i>) | Hariprasad & Niranjana, 2009 |
| <i>Pseudomonas sp.</i> | Tomate(<i>Solanum lycopersicum</i>) Alfalfa de secano (<i>Medicago polymorpha</i>) Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>) Trébol blanco (<i>Trifolium repens</i>) <i>Trifolium subterraneum</i> <i>Danthonia richardsonii</i> Alpiste(<i>Phalaris aquatica</i>) | Hariprasad & Niranjana, 2009 Richardson <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>Discosia sp.</i> FIHB 571 | Maíz (<i>Zea mays</i>) Arveja (<i>Pisum sativum</i>) Garbanzo(<i>Cicer arietinum</i>) | Rahi <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Emericella rugulosa</i> | Mijo Perla (<i>Pennisetum glaucum</i>) | Yadav & Tarafdar, 2007 |
| <i>Burkholderia sp.</i> | <i>Lotus japonicus</i> | Unno <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB45 | Col china (<i>Brassica rapa</i>) Maíz (<i>Zea mays</i>) | Ramírez & Kloepper, 2010 Idriss <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Chaetomium globosum</i> | Trigo (<i>Triticum aestivum</i>) Mijo Perla (<i>Pennisetum glaucum</i>) | Tarafdar & Gharu, 2006 |
| <i>Aspergillus rugulosus</i> | Trigo (<i>Triticum aestivum</i>) Garbanzo (<i>Cicer arietinum</i>) | Tarafdar & Rao, 1996 |

ANEXO II-Cepas de rizobios, *Streptomyces* y *Bacillus* evaluadas en esta tesis

Tabla 10. Cepas de rizobios utilizadas en este trabajo, especies y plantas huéspedes.

| Cepa | Especie | Planta huésped |
|-----------|---|--|
| U102 | <i>Sinorhizobium melilotii</i> | <i>Medicago sativa</i> |
| U104 | <i>Sinorhizobium melilotii</i> | <i>Medicago sativa</i> , y otros |
| U114 | <i>Sinorhizobium melilotii</i> | <i>Medicago sativa</i> |
| U124 | <i>Sinorhizobium melilotii</i> | <i>Medicago sativa</i> |
| U136 | <i>Sinorhizobium melilotii</i> | <i>Medicago sativa</i> |
| U137 | <i>Sinorhizobium melilotii</i> | <i>Medicago sativa</i> |
| U139 | <i>Sinorhizobium melilotii</i> | <i>Medicago sativa</i> |
| U143* | <i>Sinorhizobium melilotii</i> | <i>Medicago sativa</i> |
| U144 | <i>Sinorhizobium melilotii</i> | <i>Medicago sativa</i> |
| U149 | <i>Sinorhizobium melilotii</i> | <i>Medicago sativa</i> |
| U204* | <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> | <i>T. repense</i> , y otros |
| U206* | <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> | <i>T. alexandrinum</i> , y otros |
| U221 | <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> | <i>T. argutum</i> , y otros |
| U223* | <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> | <i>T. resupinatum</i> |
| U245 | <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> | <i>T. subt. Mount Barker</i> |
| U262* | <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> | <i>T. incarnatum</i> , y otros |
| U276* | <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> | <i>T. vesiculosum</i> |
| U2082* | <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> | <i>Trifolium balansae</i> |
| U308 | <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i> | <i>Lens sculenta</i> |
| U313 | <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i> | <i>Vicia</i> sp. |
| U315* | <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i> | <i>Pisum sativum</i> |
| U331* | <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i> | <i>Vicia sativa</i> |
| U336 | <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i> | <i>Lathyrus sativus</i> |
| U344* | <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i> | <i>Lathyrus sativus</i> , y otros |
| U405 | <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| U408 | <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> | <i>Phaseolus</i> spp. |
| U409 | <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| U416 | <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| U510* | <i>Mesorhizobium huakuii</i> | <i>L. corniculatus</i> , y otros |
| U531* | <i>Mesorhizobium loti</i> | <i>L. subbiflorus</i> |
| U612* | <i>Bradyrhizobium</i> sp. | <i>Ornithopus compressus</i> , y otros |
| U616 | <i>Bradyrhizobium</i> sp. | <i>Lupinus</i> sp. |
| U620* | <i>Bradyrhizobium</i> sp. | <i>Ornithopus compressus</i> , y otros |
| U664 | <i>Bradyrhizobium</i> sp. | <i>Ornithopus</i> sp., y otros |
| U667 | <i>Bradyrhizobium</i> sp. | <i>Arachis hypogaea</i> |
| U705 | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | <i>Glycine max</i> |
| U710 | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | <i>Glycine max</i> |
| U719 | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | <i>Glycinemax</i> |
| U724 | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | <i>Glycine max</i> |
| U737 | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | <i>Glycine max</i> |
| U801/U802 | <i>R. tropici</i> | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| U803 | <i>R. tropici</i> | <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Leucaena</i> sp. |
| U806 | <i>R. tropici</i> | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| U808* | <i>R. tropici</i> | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| U809* | <i>R. tropici</i> | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| U1205* | <i>Methylobacterium</i> sp. | <i>Lotononis bainesii</i> Baker |
| U1301* | <i>Bradyrhizobium elkanii</i> | <i>Glycine max</i> |
| U1302* | <i>Bradyrhizobium elkanii</i> | <i>Glycine max</i> |
| U1401* | <i>Bradyrhizobium loti</i> | <i>L. uliginosus</i> , <i>Maku</i> |

*Cepas recomendadas para su uso comercial en Uruguay como inoculantes de sus respectivas plantas huésped.

Tabla 11. Cepas de *Streptomyces* utilizadas en este trabajo y su especie asignada (Vaz, comunicación personal, 2018).

| Cepa | Especie |
|--------|--|
| P21.1 | <i>S. lydicus</i> |
| P21.2 | <i>S. griseorubiginosus/ S. phaelopurpureous</i> |
| P21.3 | <i>S. psammoticus</i> |
| P21.4 | <i>S. chattanoogenesisis</i> |
| P21.5 | <i>S. malaysiensis</i> |
| P21.7 | <i>S. sp.</i> |
| P21.8 | <i>S. lannensis</i> |
| P21.9 | <i>S. olivoidris/ S. psammoticus</i> |
| P21.10 | <i>S. chartreusis</i> |
| P21.11 | <i>S. spinichromogenes</i> |
| P21.12 | <i>S. lydicus</i> |
| P21.13 | <i>S. kagawaensis</i> |
| P21.14 | <i>S. chattanoogenesisis</i> |
| P21.15 | <i>S. lydicus</i> |
| P21.17 | <i>Amycolaptosis</i> ¹² |
| P27.1 | <i>S. coelicolor/ S. regalis/ S. cyaneus</i> |
| P27.2 | <i>S. chartreusis</i> |
| P27.3 | <i>S. sviceus</i> |
| P27.4 | <i>S. ciscaucasicus</i> <i>S. canus</i> |
| P27.5 | <i>S. pseudovenezuelae</i> |
| P27.6 | <i>S. chartreusis</i> |
| P27.7 | <i>S. sp.</i> |
| P27.8 | <i>S. longwoodensis</i> |
| P27.9 | <i>S. achromagenes</i> |
| P27.11 | <i>S. bungoensis</i> |
| P27.12 | <i>S. hygrosopicus</i> |
| P27.13 | <i>S. rishiriensis</i> |
| P27.14 | <i>S. rishiriensis</i> |
| P27.16 | <i>S. sviceus</i> |
| P30.1 | <i>S. chartreusis</i> |
| P30.2 | <i>S. sp.</i> |
| P30.4 | <i>S. albiflabescens</i> |
| P30.5 | <i>S. purpurascens</i> |
| P30.6 | <i>S. sp.</i> |
| P30.7 | <i>S. sp.</i> |
| P30.8 | <i>S. luteogriseus</i> |

¹² Posteriormente al comienzo de esta tesis, esta cepa se reclasificó como *Amycolaptosis*.

| | |
|---------------|-------------------------------|
| P30.10 | <i>S. sp.</i> |
| P30.11 | <i>S. sp.</i> |
| P30.12 | <i>Kitasatorspora/ S. sp.</i> |
| P30.13 | <i>S. ciscaucasicus</i> |

Tabla 12. Cepas de *Bacillus* utilizadas en este trabajo, especie, procedencia y número de acceso de la secuencia ARNr 16S en el *GenBank*.

| Cepa | Especie | Procedencia | Número de Acceso <i>GenBank</i> |
|------------------|---|-------------------------|--|
| ILBB 210 | <i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> ¹³ | <i>Borellia bruneri</i> | KT340486 |
| ILBB 224 | <i>B. thuringiensis</i> | <i>Cocytotettix sp.</i> | KT340483 |
| ILBB 230 | <i>B. thuringiensis</i> | <i>Borellia bruneri</i> | KT340481 |
| ILBB 297 | <i>B. thuringiensis</i> | <i>Borellia bruneri</i> | KT340482 |
| ILBB 505 | <i>B. pumilus</i> | <i>Borellia bruneri</i> | KT340484 |
| ILBB 510 | <i>B. aryabhatai</i> | <i>Borellia bruneri</i> | KT340475 |
| ILBB 551 | <i>B. thuringiensis</i> | Suelo | KT340479 |
| ILBB 582 | <i>B. amyloliquefaciens</i> | Suelo | KT340485 |
| ILBB 592 | <i>B. megaterium</i> | Suelo | KT340477 |
| DSM 23778 | <i>B. subtilis</i> | Leibniz-Institut DSMZ | M87887 |

¹³ Posteriormente al comienzo de esta tesis, esta cepa se reclasificó como *Lysinibacillus xylanilyticus*.

ANEXO III-Medios de cultivo y soluciones

| Medio Angle Modificado | |
|--|--------------------------|
| KNO ₃ | 0,10 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,49 g |
| CaSO ₄ ·2H ₂ O | 0,69 g |
| Glucosa | 9,90 g |
| Tiamina-HCl (100 mg.L ⁻¹) | 500,00 µL |
| Citrato-Fe 1% (m/v) | 500,00 µL |
| Microelementos ^a | 200,00 µL |
| Agarosa ¹⁴ | 10,00 g |
| H ₂ O miliQ | c.s.p. ¹⁵ 1 L |
| FePO ₄ o | 3,50 g |
| AlPO ₄ o | 3,50 g |
| Ca ₃ (PO ₄) ₂ o | 5,00 g |
| (Na) ₁₂ Fitato 0,22 M-pH 7 ^b | 27,00 µL |

Ajustar el pH a 7.

Esterilizar durante 20 min a 121°C.

a

| Solución de Microelementos (Medio Angle Modificado) | |
|---|------------|
| H ₃ BO ₃ | 2,82 g |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 98,00 mg |
| MnSO ₄ ·H ₂ O | 3,08 g |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0,29 g |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 4,41 g |
| H ₂ O miliQ | c.s.p. 1 L |

Conservar la solución a 4°C.

^b Se ajusta el pH a 7 a una solución de Fitato de Sodio 0,22 M y se esteriliza por filtración (0,2 µm). Luego, se agrega la solución al medio de cultivo esterilizado y tibio (50-60°C). Preparar la solución en el momento de uso, no se conserva.

¹⁴ Cuando sea necesario.

¹⁵ Abreviatura para "cantidad suficiente para".

| Medio YEM | |
|--|--------------|
| K₂HPO₄ | 0,5 g |
| MgSO₄.7H₂O | 0,2 g |
| NaCl | 0,1 g |
| Extracto de Levadura | 0,5 g |
| FeCl₃.6H₂O 10 % (m/V) | Una gota |
| Manitol | 10,0 g |
| MnSO₄ 10 % (m/V) | Una gota |
| Agar¹⁶ | 15,0 g |
| H₂O | c.s.p. 1,0 L |

Ajustar el pH a 6,8-7.

Esterilizar durante 20 min a 121°C.

| Medio TY | |
|---|--------------|
| Triptona | 10,0 g |
| Extracto de Levadura | 1,0 g |
| CaCl₂.2H₂O | 0,3 g |
| Agar¹⁷ | 15,0 g |
| H₂O | c.s.p. 1,0 L |

Ajustar el pH a 7.

Esterilizar durante 20 min a 121°C.

| Medio Agar-Avena | |
|-----------------------|------------|
| Avena | 20 g |
| Casaminoácidos | 1 g |
| Agar | 15 g |
| H₂O | c.s.p. 1 L |

Esterilizar durante 20 min a 121°C.

¹⁶ Cuando sea necesario.

¹⁷ Cuando sea necesario.

| Medio YD | |
|-----------------------------------|------------|
| Extracto de Levadura | 1 g |
| Dextrosa | 1 g |
| H₂O_d | c.s.p. 1 L |

Esterilizar durante 20 min a 121°C.

| Medio TSA | |
|-----------------------------------|------------|
| Polisorbato 80 | 5 g |
| Histidina | 1 g |
| Peptona de Soja | 5 g |
| Sodio Tiosulfato | 0,5 g |
| Lecitina | 0,7 g |
| Peptona de Caseína | 15 g |
| NaCl | 5 g |
| Agar | 15 g |
| H₂O_d | c.s.p. 1 L |

Esterilizar durante 20 min a 121°C.

| Medio TSB | |
|-----------------------------------|------------|
| Polisorbato 80 | 5 g |
| Histidina | 1 g |
| Peptona de Soja | 5 g |
| Sodio Tiosulfato | 0,5 g |
| Lecitina | 0,7 g |
| Peptona de Caseína | 15 g |
| NaCl | 5 g |
| H₂O_d | c.s.p. 1 L |

Esterilizar durante 20 min a 121°C.

| NaCl 0,85 % (m/v) | |
|-----------------------------|------------|
| NaCl | 8,5 mg |
| H₂O miliQ | c.s.p. 1 L |

Esterilizar durante 20 min a 121°C.

| Mezcla Colorimétrica (Método Vanado Molibdato) | |
|---|--------|
| Heptamolibdato de amonio 1,9 % (m/v) ^c | 333 mL |
| Vanadato de amonio 0,09 % (m/v) ^d | 333 mL |
| Ácido nítrico 1,5 M ^e | 333 mL |

Preparar la solución en el momento de uso, no se conserva.

c

| Heptamolibdato de Amonio 1,9 % (m/v) | |
|--|------------|
| $\text{H}_{24}\text{Mo}_7\text{N}_6\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 19 g |
| H_2O miliQ | c.s.p. 1 L |

Solución estable por un mes a temperatura ambiente protegida de la luz.

d

| Vanadato de Amonio 0,09 % (m/v) | |
|---------------------------------|------------|
| NH_4VO_3 | 0,9 g |
| HNO_3 69% (m/v) | 24,0 mL |
| H_2O miliQ | c.s.p. 1 L |

Solución estable por un mes a temperatura ambiente protegida de la luz.

e

| Ácido nítrico 1,5 M | |
|----------------------------|------------|
| HNO_3 69 % (m/v) | 97 mL |
| H_2O miliQ | c.s.p. 1 L |

Preparar la solución en el momento de uso, no se conserva.

| Soluciones Patrón de P (Método Vanado Molibdato) | |
|---|--|
| Concentración P ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) | mL a tomar de la solución <i>stock</i> ($1\text{ g P}\cdot\text{L}^{-1}$) ^f |
| 0 | 0,0 |
| 5 | 1,0 |
| 10 | 2,0 |
| 20 | 3,5 |
| 35 | 5,0 |
| 50 | 7,5 |
| 75 | 10,0 |

| | |
|------------|------|
| 100 | 13,0 |
| 130 | 17,0 |
| 170 | 20,0 |

Agregar a cada matraz 2,7 mL de HCl 15N y H₂O miliQ c.s.p. 1 L. Homogeneizar.

f

| Solución Stock (1 g P.L ⁻¹) | |
|---|------------|
| KH₂PO₄ ¹⁸ | 4,2 g |
| H₂O miliQ | c.s.p. 1 L |

| Medio ISP2 | |
|-----------------------------|------------|
| Extracto de Levadura | 4 g |
| Extracto de Malta | 10 g |
| Dextrosa | 4 g |
| Agar | 15 g |
| H₂O | c.s.p. 1 L |

Ajustar el pH a 7,3.

Esterilizar durante 20 min a 121°C.

| Soluciones Stock para Solución Nutritiva Somasegaran & Hoben (1985) | |
|---|------------------------------------|
| Compuesto | Concentración (g.L ⁻¹) |
| CaCl₂.2H₂O | 294,10 |
| KH₂PO₄ | 136,10 |
| Fe-EDTA | 4,50 |
| Citrato-Fe | 6,70 |
| MgSO₄.7H₂O | 123,30 |
| K₂SO₄ | 87,00 |
| MnSO₄.4H₂O | 0,34 |
| H₃BO₃ | 0,25 |
| ZnSO₄.7H₂O | 0,29 |
| CuSO₄.7H₂O | 0,10 |
| CoSO₄.7H₂O | 0,06 |
| Na₂MoO₄.2H₂O | 0,05 |

¹⁸ Previamente secado.

Diluir 100 mL de cada solución *stock* en 10 L de H₂O_d, ajustar pH a 6,6-6,8 y diluir 500 mL de esta nueva solución en 10 L de H₂O_d.

| Buffer de Lisis | |
|-----------------------------------|--------|
| NaOH | 0,1 g |
| SDS | 0,5 g |
| H₂O_d | 200 mL |

| Gel de Agarosa 1,5 % (m/V) | |
|-----------------------------------|------------|
| Agarosa | 15 g |
| TAE 1X^g | c.s.p. 1 L |

g

| TAE 1X | |
|--|------------|
| Tris | 4,85 g |
| Ácido acético | 1,20 g |
| EDTA | 0,29 |
| H₂O_d¹⁹ | c.s.p. 1 L |

| Reactivo 1 (Método Verde de Malaquita) | |
|--|------------|
| H₂SO₄ 98 % (m/V) | 168,00 mL |
| H₂₄Mo₇N₆O₂₄·4H₂O | 17,55 g |
| H₂O miliQ | c.s.p. 1 L |

Conservar la solución a 4°C.

| Reactivo 2 (Método Verde de Malaquita) | |
|---|------------|
| Alcohol polivinílico (PVA) | 3,50 g |
| Oxalato de verde de malaquita (C₄₆H₅₀N₄2(C₂HO₄)C₂H₂O₄) | 0,35 g |
| H₂O miliQ | c.s.p. 1 L |

¹⁹ En los casos donde se utilizó esta solución para trabajar con ARN el H₂O utilizada fue H₂O DEPC, y se realizó la solución en material de vidrio libre de ARNasa.

| Soluciones Patrón de P (Método Verde de Malaquita) | |
|--|--|
| Concentración P (μM) | μL a tomar de la solución <i>stock</i> (1 g P.L^{-1}) |
| 0 | 0 |
| 5 | 155 |
| 10 | 310 |
| 20 | 620 |
| 30 | 930 |
| 50 | 1550 |

Agregar a cada matraz 2,7 mL de HCl 15N y H₂O miliQ c.s.p. 1 L. Homogeneizar.

| Soluciones Patrón de ARN | |
|---|---|
| Concentración ARN (ng.mL^{-1}) | μL a tomar de la solución <i>stock</i> patrón ARN 2000 ng.mL^{-120} |
| 0 | 0 |
| 20 | 1 |
| 100 | 5 |
| 500 | 25 |
| 1000 | 50 |

Agregar a cada microtubo estéril libre de ARNasa H₂O DEPC c.s.p. 100 μL . Homogeneizar.

| Solución Nutritiva Kalia y Drevon (1985) (Cultivo hidroaeropónico de leguminosas) | |
|---|------------|
| K ₂ SO ₄ 0,5 M | 1,50 mL |
| MgSO ₄ .7H ₂ O 0,5 M | 2,00 mL |
| CaCl ₂ 2,2 M | 0,75 mL |
| Secuestrante 138 de Fe 100 SG (SYNGENTA) 16,6 g.L^{-1} | 0,50 mL |
| Oligoelementos ^h | 0,02 mL |
| Urea <i>starter</i> 1 M ²¹ | 1,00 mL |
| KH ₂ PO ₄ 0,1 M | |
| P suficiente | 2,50 mL |
| P deficiente | 0,75 mL |
| CaCO ₃ | 0,70 g |
| H ₂ O _d | c.s.p. 1 L |

²⁰ Suministrada por el kit *Quanti-iT RiboGreen RNA Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific).

²¹ Agregar solamente durante las dos primeras semanas de cultivo.

h

| Solución de Oligoelementos (Kalia & Drevon, 1985) | |
|--|------------|
| H₃BO₃ | 6,25 g |
| MnSO₄.H₂O | 25,00 g |
| ZnSO₄.7H₂O | 6,25 g |
| CuSO₄.5H₂O | 6,25 g |
| Na₂MoO₄.2H₂O | 0,63 g |
| H₂O_d | c.s.p. 1 L |

| Solución Fijadora | |
|---|--------------|
| Paraformaldehído (PFA) 8 % (m/V) | 10 mL |
| Etanol 100 % | 9 mL |
| Ácido Acético | 1 mL |

| PBS 10X | |
|--------------------------------------|------------|
| Na₂HPO₄ | 7 g |
| NaCl | 76 g |
| H₂O DEPC | c.s.p. 1 L |

Ajustar el pH a 7,5.

Esterilizar durante 40 min a 121°C.

| Buffer de Bloqueo | |
|--------------------|--------|
| BSA | 2 g |
| PBS 1X | 100 mL |
| Tritón 100X | 300 µL |

| Solución de Revelación | |
|--|--------|
| ELF-97 (ThermoFisher Scientific) | 20 µL |
| Buffer ELF-97 (ThermoFisher Scientific) | 780 µL |

Realizar la solución de revelación en un microtubo estéril y libre de ARNasa recubierto con papel de aluminio. Luego de agregar los componentes, vortexear, centrifugar 30 s al máximo alcanzado por la centrifuga y filtrar en un nuevo microtubo estéril y libre de ARNasa recubierto con papel de aluminio, con un filtro 0,22 µm estéril.

| <i>Buffer de Lavado 1X</i> | |
|----------------------------|------------|
| PBS 10X | 10 mL |
| EDTA 500 mM | 5 mL |
| H₂O DEPC | c.s.p. 1 L |

Ajustar el pH a 8.

Esterilizar durante 40 min a 121°C.

ANEXO IV-Análisis de la varianza de todas las variables determinadas.

CAPACIDAD DE SOLUBILIZACIÓN Y/O MINERALIZACIÓN DE FÓSFORO *in vitro*

- Solubilización y/o mineralización de fósforo en medio sólido

Tabla 13. Análisis de la varianza para la variable índice de solubilización en medio Angle modificado pH 7 suplementado con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ inoculado con las cepas rizobianas.

| | Grados de libertad (gl) | Suma de cuadrados (SC) | Cuadrado medio (CM) | F | p-valor |
|------------|-------------------------|------------------------|---------------------|-------|---------|
| Cepa | 20 | 7,24 | 0,36 | 90,92 | <0,0001 |
| Residuales | 42 | 0,17 | 0,004 | | |

Tabla 14 Análisis de la varianza para la variable índice de solubilización en medio Angle modificado pH 7 suplementado con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ inoculado con las cepas de *Streptomyces*.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|-------|-------|------|---------|
| Cepa | 1 | 0,048 | 0,048 | 0,38 | 0,541 |
| Residuales | 37 | 4,71 | 0,13 | | |

Tabla 15. Análisis de la varianza para la variable índice de solubilización en medio Angle modificado pH 7 suplementado con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ inoculado con las cepas de *Bacillus*.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|-------|---------|
| Cepa | 1 | 0,31 | 0,31 | 16,95 | 0,001 |
| Residuales | 13 | 0,24 | 0,02 | | |

Tabla 16. Análisis de la varianza para la variable índice de mineralización en medio Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio inoculado con las cepas rizobianas.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|---------|-------|---------|
| Cepa | 10 | 3,23 | 0,32 | 75,09 | <0,0001 |
| Residuales | 19 | 0,08 | 4,3e-03 | | |

Tabla 17. Análisis de la varianza para la variable índice de mineralización en medio Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio inoculado con las cepas de *Streptomyces*.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|-------|---------|
| Cepa | 10 | 2,63 | 0,26 | 35,85 | <0,0001 |
| Residuales | 22 | 0,16 | 0,01 | | |

Tabla 18. Análisis de la varianza para la variable índice de mineralización en medio Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio inoculado con las cepas de *Bacillus*.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|---------|---------|------|---------|
| Cepa | 3 | 1,7e-04 | 5,8e-05 | 0,02 | 0,9951 |
| Residuales | 8 | 0,02 | 2,6e-03 | | |

- **Mineralización de fósforo en medio líquido**

Tabla 19. Análisis de la varianza para la variable actividad mineralizadora de fitato de sodio, expresada como P liberado al medio de cultivo, de las cepas rizobianas a las 144 h de incubación en el medio líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|---------|--------|-------|---------|
| Cepa | 10 | 5139,90 | 513,99 | 40,28 | <0,0001 |
| Residuales | 21 | 267,96 | 12,76 | | |

Tabla 20. Análisis de la varianza para la variable actividad mineralizadora de fitato de sodio, expresada como P liberado al medio de cultivo, de las cepas rizobianas a las 336 h de incubación en el medio líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|---------|--------|-------|---------|
| Cepa | 10 | 3941,77 | 394,18 | 22,12 | <0,0001 |
| Residuales | 22 | 392,04 | 17,82 | | |

Tabla 21. Análisis de la varianza para la variable actividad mineralizadora de fitato de sodio, expresada como P liberado al medio de cultivo, de las cepas de *Streptomyces* a las 144 h de incubación en el medio líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|---------|--------|-------|---------|
| Cepa | 10 | 3073,68 | 307,37 | 35,16 | <0,0001 |
| Residuales | 18 | 157,36 | 8,74 | | |

Tabla 22. Análisis de la varianza para la variable actividad mineralizadora de fitato de sodio, expresada como P liberado al medio de cultivo, de las cepas de *Streptomyces* a las 336 h de incubación en el medio líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|---------|--------|-------|---------|
| Cepa | 10 | 5886,62 | 588,66 | 31,68 | <0,0001 |
| Residuales | 18 | 334,46 | 18,58 | | |

Tabla 23. Análisis de la varianza para la variable actividad mineralizadora de fitato de sodio, expresada como P liberado al medio de cultivo, de las cepas de *Bacillus* a las 144 h de incubación en el medio líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|--------|-------|------|---------|
| Cepa | 3 | 250,24 | 83,41 | 7,51 | 0,0103 |
| Residuales | 8 | 88,81 | 11,10 | | |

Tabla 24. Análisis de la varianza para la variable actividad mineralizadora de fitato de sodio, expresada como P liberado al medio de cultivo, de las cepas de *Bacillus* a las 336 h de incubación en el medio líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|---------|--------|--------|---------|
| Cepa | 3 | 2040,69 | 680,23 | 134,07 | <0,0001 |
| Residuales | 7 | 35,52 | 5,07 | | |

Tabla 25. Análisis de la varianza para la variable pH del medio de cultivo líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio en el último día de incubación (día 16) inoculado con la cepa U102.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|------|------|-------|---------|
| Cepa | 1 | 3,99 | 3,99 | 65,96 | <0,0001 |
| Residuales | 24 | 1,45 | 0,06 | | |

Tabla 26. Análisis de la varianza para la variable pH del medio de cultivo líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio en el último día de incubación (día 16) inoculado con la cepa U143.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|------|------|--------|---------|
| Cepa | 1 | 5,96 | 5,96 | 141,84 | <0,0001 |
| Residuales | 24 | 1,01 | 0,04 | | |

Tabla 27. Análisis de la varianza para la variable pH del medio de cultivo líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio en el último día de incubación (día 16) inoculado con la cepa U276.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|------|------|-------|---------|
| Cepa | 1 | 0,95 | 0,95 | 22,64 | 0,0001 |
| Residuales | 24 | 1,01 | 0,04 | | |

Tabla 28. Análisis de la varianza para la variable pH del medio de cultivo líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio en el último día de incubación (día 16) inoculado con la cepa U331.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|---------|---------|------|---------|
| Cepa | 1 | 2,3e-03 | 2,3e-03 | 0,05 | 0,8245 |
| Residuales | 24 | 1,08 | 0,04 | | |

Tabla 29. Análisis de la varianza para la variable pH del medio de cultivo líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio en el último día de incubación (día 16) inoculado con la cepa U336.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|---------|---------|------|---------|
| Cepa | 1 | 1,8e-03 | 1,8e-03 | 0,04 | 0,8407 |
| Residuales | 24 | 1,03 | 0,04 | | |

Tabla 30. Análisis de la varianza para la variable pH del medio de cultivo líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio en el último día de incubación (día 16) inoculado con la cepa U344.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|------|------|-------|---------|
| Cepa | 1 | 2,21 | 2,21 | 52,09 | <0,0001 |
| Residuales | 24 | 1,02 | 0,04 | | |

Tabla 31. Análisis de la varianza para la variable pH del medio de cultivo líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio en el último día de incubación (día 16) inoculado con la cepa U409.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 1 | 0,40 | 0,40 | 9,60 | 0,0049 |
| Residuales | 24 | 1,00 | 0,04 | | |

Tabla 32. Análisis de la varianza para la variable pH del medio de cultivo líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio en el último día de incubación (día 16) inoculado con la cepa U664.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|------|------|--------|---------|
| Cepa | 1 | 9,74 | 9,74 | 228,50 | <0,0001 |
| Residuales | 24 | 1,02 | 0,04 | | |

Tabla 33. Análisis de la varianza para la variable pH del medio de cultivo líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio en el último día de incubación (día 16) inoculado con la cepa U705.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|-------|-------|--------|---------|
| Cepa | 1 | 15,45 | 15,45 | 368,09 | <0,0001 |
| Residuales | 24 | 1,01 | 0,04 | | |

Tabla 34. Análisis de la varianza para la variable pH del medio de cultivo líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio en el último día de incubación (día 16) inoculado con la cepa U802.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 1 | 0,42 | 0,42 | 9,80 | 0,0045 |
| Residuales | 24 | 1,02 | 0,04 | | |

Tabla 35. Análisis de la varianza para la variable pH del medio de cultivo líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio en el último día de incubación (día 16) inoculado con la cepa U808.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|------|------|-------|---------|
| Cepa | 1 | 1,32 | 1,32 | 31,58 | <0,0001 |
| Residuales | 24 | 1,00 | 0,04 | | |

Tabla 36. Análisis de la varianza para la variable pH del medio de cultivo líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio en el último día de incubación (día 16) inoculado con la cepa P21.3.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|------|------|--------|---------|
| Cepa | 1 | 7,21 | 7,21 | 115,92 | <0,0001 |
| Residuales | 27 | 1,68 | 0,06 | | |

Tabla 37. Análisis de la varianza para la variable pH del medio de cultivo líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio en el último día de incubación (día 16) inoculado con la cepa P21.7.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 1 | 0,40 | 0,40 | 9,49 | 0,0051 |
| Residuales | 24 | 1,02 | 0,04 | | |

Tabla 38. Análisis de la varianza para la variable pH del medio de cultivo líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio en el último día de incubación (día 16) inoculado con la cepa P21.10.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|------|------|-------|---------|
| Cepa | 1 | 0,96 | 0,96 | 22,25 | 0,0001 |
| Residuales | 24 | 1,04 | 0,04 | | |

Tabla 39. Análisis de la varianza para la variable pH del medio de cultivo líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio en el último día de incubación (día 16) inoculado con la cepa P27.1.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 1 | 0,07 | 0,07 | 1,57 | 0,2218 |
| Residuales | 24 | 1,11 | 0,05 | | |

Tabla 40. Análisis de la varianza para la variable pH del medio de cultivo líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio en el último día de incubación (día 16) inoculado con la cepa P27.2.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|------|------|-------|---------|
| Cepa | 1 | 8,30 | 8,30 | 28,46 | <0,0001 |
| Residuales | 27 | 7,88 | 0,29 | | |

Tabla 41. Análisis de la varianza para la variable pH del medio de cultivo líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio en el último día de incubación (día 16) inoculado con la cepa P27.6.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|------|------|-------|---------|
| Cepa | 1 | 3,65 | 3,65 | 65,81 | <0,0001 |
| Residuales | 24 | 1,33 | 0,06 | | |

Tabla 42. Análisis de la varianza para la variable pH del medio de cultivo líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio en el último día de incubación (día 16) inoculado con la cepa P27.12.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|------|------|--------|---------|
| Cepa | 1 | 6,70 | 6,70 | 149,35 | <0,0001 |
| Residuales | 24 | 1,08 | 0,04 | | |

Tabla 43. Análisis de la varianza para la variable pH del medio de cultivo líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio en el último día de incubación (día 16) inoculado con la cepa P27.13.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|-------|-------|--------|---------|
| Cepa | 1 | 18,05 | 18,05 | 290,14 | <0,0001 |
| Residuales | 27 | 1,68 | 0,06 | | |

Tabla 44. Análisis de la varianza para la variable pH del medio de cultivo líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio en el último día de incubación (día 16) inoculado con la cepa P27.16.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|------|------|--------|---------|
| Cepa | 1 | 9,67 | 9,67 | 193,68 | <0,0001 |
| Residuales | 24 | 1,20 | 0,05 | | |

Tabla 45. Análisis de la varianza para la variable pH del medio de cultivo líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio en el último día de incubación (día 16) inoculado con la cepa P30.1.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|------|------|-------|---------|
| Cepa | 1 | 3,05 | 3,05 | 28,10 | <0,0001 |
| Residuales | 24 | 2,61 | 0,11 | | |

Tabla 46. Análisis de la varianza para la variable pH del medio de cultivo líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio en el último día de incubación (día 16) inoculado con la cepa P30.10.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|------|------|-------|---------|
| Cepa | 1 | 1,15 | 1,15 | 25,69 | <0,0001 |
| Residuales | 24 | 1,08 | 0,04 | | |

Tabla 47. Análisis de la varianza para la variable pH del medio de cultivo líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio en el último día de incubación (día 16) inoculado con la cepa ILBB 224.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|---------|---------|------|---------|
| Cepa | 1 | 4,4e-03 | 4,4e-03 | 0,11 | 0,7480 |
| Residuales | 24 | 1,01 | 0,04 | | |

Tabla 48. Análisis de la varianza para la variable pH del medio de cultivo líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio en el último día de incubación (día 16) inoculado con la cepa ILBB 297.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|---------|---------|------|---------|
| Cepa | 1 | 2,8e-03 | 2,8e-03 | 0,07 | 0,7992 |
| Residuales | 24 | 1,02 | 0,04 | | |

Tabla 49. Análisis de la varianza para la variable pH del medio de cultivo líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio en el último día de incubación (día 16) inoculado con la cepa ILBB 592.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|---------|---------|------|---------|
| Cepa | 1 | 3,1e-03 | 3,1e-03 | 0,07 | 0,7879 |
| Residuales | 24 | 1,01 | 0,04 | | |

Tabla 50. Análisis de la varianza para la variable pH del medio de cultivo líquido Angle modificado pH 7 suplementado con fitato de sodio en el último día de incubación (día 16) inoculado con la cepa DSM 23778.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 1 | 0,44 | 0,44 | 5,70 | 0,0242 |
| Residuales | 27 | 2,11 | 0,08 | | |

ENSAYOS DE COMPATIBILIDAD

- **Ensayo de compatibilidad *in vivo***

Tabla 51. Análisis de la varianza para la variable peso seco parte aérea de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409 (10^7 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 1 | 0,10 | 0,10 | 0,36 | 0,5796 |
| Residuales | 4 | 1,09 | 0,27 | | |

Tabla 52. Análisis de la varianza para la variable peso seco parte aérea de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409 (10^6 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 1 | 0,29 | 0,29 | 1,08 | 0,3564 |
| Residuales | 4 | 1,09 | 0,27 | | |

Tabla 53. Análisis de la varianza para la variable peso seco parte aérea de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409 (10^5 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 1 | 1,18 | 1,18 | 6,21 | 0,0673 |
| Residuales | 4 | 0,76 | 0,19 | | |

Tabla 54. Análisis de la varianza para la variable peso seco parte aérea de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *S. chartreusis* P21.10 (10^7 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 1 | 0,17 | 0,17 | 0,44 | 0,5450 |
| Residuales | 4 | 1,59 | 0,40 | | |

Tabla 55. Análisis de la varianza para la variable peso seco parte aérea de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *S. chartreusis* P21.10 (10^6 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 1 | 0,03 | 0,03 | 0,16 | 0,7057 |
| Residuales | 4 | 0,71 | 0,18 | | |

Tabla 56. Análisis de la varianza para la variable peso seco parte aérea de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *S. chartreusis* P21.10 (10^5 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 1 | 0,98 | 0,98 | 4,10 | 0,1130 |
| Residuales | 4 | 0,95 | 0,24 | | |

Tabla 57. Análisis de la varianza para la variable peso seco parte aérea de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *B. megaterium* ILBB 592 (10^7 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 1 | 0,90 | 0,90 | 4,01 | 0,1159 |
| Residuales | 4 | 0,90 | 0,23 | | |

Tabla 58. Análisis de la varianza para la variable peso seco parte aérea de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *B. megaterium* ILBB 592 (10^6 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 1 | 1,57 | 1,57 | 5,32 | 0,0824 |
| Residuales | 4 | 1,18 | 0,30 | | |

Tabla 59. Análisis de la varianza para la variable peso seco parte aérea de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *B. megaterium* ILBB 592 (10^5 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 1 | 0,34 | 0,34 | 1,05 | 0,3643 |
| Residuales | 4 | 1,29 | 0,32 | | |

Tabla 60. Análisis de la varianza para la variable peso seco de nódulos de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409 (10^7 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|----------|---------|------|---------|
| Cepa | 1 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | >0,9999 |
| Residuales | 4 | 37451,85 | 9362,96 | | |

Tabla 61. Análisis de la varianza para la variable peso seco de nódulos de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409 (10^6 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|----------|---------|------|---------|
| Cepa | 1 | 134,43 | 134,43 | 0,02 | 0,8848 |
| Residuales | 4 | 22565,71 | 5641,43 | | |

Tabla 62. Análisis de la varianza para la variable peso seco de nódulos de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409 (10^5 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|----------|---------|---------|---------|
| Cepa | 1 | 10,94 | 10,94 | 1,9e-03 | 0,9673 |
| Residuales | 4 | 23045,53 | 5761,38 | | |

Tabla 63. Análisis de la varianza para la variable peso seco de nódulos de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *S. chartreusis* P21.10 (10^7 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|----------|---------|---------|---------|
| Cepa | 1 | 19,80 | 19,80 | 2,1e-03 | 0,9653 |
| Residuales | 4 | 36918,67 | 9229,67 | | |

Tabla 64. Análisis de la varianza para la variable peso seco de nódulos de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *S. chartreusis* P21.10 (10^6 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|----------|---------|------|---------|
| Cepa | 1 | 686,94 | 686,94 | 0,12 | 0,7438 |
| Residuales | 4 | 22402,37 | 5600,59 | | |

Tabla 65. Análisis de la varianza para la variable peso seco de nódulos de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *S. chartreusis* P21.10 (10^5 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|----------|---------|------|---------|
| Cepa | 1 | 564,54 | 564,54 | 0,11 | 0,7595 |
| Residuales | 4 | 21018,17 | 5254,54 | | |

Tabla 66. Análisis de la varianza para la variable peso seco de nódulos de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *B. megaterium* ILBB 592 (10^7 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|----------|---------|------|---------|
| Cepa | 1 | 1552,04 | 1552,04 | 0,31 | 0,6068 |
| Residuales | 4 | 19965,55 | 4991,39 | | |

Tabla 67. Análisis de la varianza para la variable peso seco de nódulos de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *B. megaterium* ILBB 592 (10^6 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|----------|---------|---------|---------|
| Cepa | 1 | 7,71 | 7,71 | 1,2e-03 | 0,9741 |
| Residuales | 4 | 25831,67 | 6457,92 | | |

Tabla 68. Análisis de la varianza para la variable peso seco de nódulos de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *B. megaterium* ILBB 592 (10^5 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|----------|---------|------|---------|
| Cepa | 1 | 218,41 | 218,41 | 0,04 | 0,8575 |
| Residuales | 4 | 23838,35 | 5959,59 | | |

Tabla 69. Análisis de la varianza para la variable peso seco de raíz de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409 (10^7 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 1 | 0,10 | 0,10 | 0,26 | 0,6340 |
| Residuales | 4 | 1,49 | 0,37 | | |

Tabla 70. Análisis de la varianza para la variable peso seco de raíz de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409 (10^6 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 1 | 0,24 | 0,24 | 1,13 | 0,3483 |
| Residuales | 4 | 0,87 | 0,22 | | |

Tabla 71. Análisis de la varianza para la variable peso seco de raíz de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409 (10^5 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 1 | 0,09 | 0,09 | 0,75 | 0,4341 |
| Residuales | 4 | 0,45 | 0,11 | | |

Tabla 72. Análisis de la varianza para la variable peso seco de raíz de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *S. chartreusis* P21.10 (10^7 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 1 | 0,80 | 0,80 | 1,80 | 0,2504 |
| Residuales | 4 | 1,77 | 0,44 | | |

Tabla 73. Análisis de la varianza para la variable peso seco de raíz de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *S. chartreusis* P21.10 (10^6 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 1 | 0,05 | 0,05 | 0,17 | 0,6988 |
| Residuales | 4 | 1,08 | 0,27 | | |

Tabla 74. Análisis de la varianza para la variable peso seco de raíz de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *S. chartreusis* P21.10 (10^5 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 1 | 0,67 | 0,67 | 1,06 | 0,3612 |
| Residuales | 4 | 2,51 | 0,63 | | |

Tabla 75. Análisis de la varianza para la variable peso seco de raíz de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *B. megaterium* ILBB 592 (10^7 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 1 | 0,17 | 0,17 | 0,76 | 0,4329 |
| Residuales | 4 | 0,88 | 0,22 | | |

Tabla 76. Análisis de la varianza para la variable peso seco de raíz de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *B. megaterium* ILBB 592 (10^6 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 1 | 0,41 | 0,41 | 0,47 | 0,5312 |
| Residuales | 4 | 3,51 | 0,88 | | |

Tabla 77. Análisis de la varianza para la variable peso seco de raíz de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *B. megaterium* ILBB 592 (10^5 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 1 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,6439 |
| Residuales | 4 | 3,98 | 1,00 | | |

Tabla 78. Análisis de la varianza para la variable número de nódulos, transformada logarítmicamente, de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409 (10^7 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|---------|---------|------|---------|
| Cepa | 1 | 2,5e-03 | 2,5e-03 | 0,35 | 0,5839 |
| Residuales | 4 | 0,03 | 0,01 | | |

Tabla 79. Análisis de la varianza para la variable número de nódulos, transformada logarítmicamente, de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409 (10^6 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|---------|---------|------|---------|
| Cepa | 1 | 3,0e-03 | 3,0e-03 | 0,46 | 0,5336 |
| Residuales | 4 | 0,03 | 0,01 | | |

Tabla 80. Análisis de la varianza para la variable número de nódulos, transformada logarítmicamente, de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409 (10^5 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 1 | 0,03 | 0,03 | 2,34 | 0,2009 |
| Residuales | 4 | 0,05 | 0,01 | | |

Tabla 81. Análisis de la varianza para la variable número de nódulos, transformada logarítmicamente, de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *S. chartreusis* P21.10 (10^7 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|---------|---------|------|---------|
| Cepa | 1 | 6,6e-05 | 6,6e-05 | 0,01 | 0,9230 |
| Residuales | 4 | 0,03 | 0,01 | | |

Tabla 82. Análisis de la varianza para la variable número de nódulos, transformada logarítmicamente, de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *S. chartreusis* P21.10 (10^6 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|---------|---------|------|---------|
| Cepa | 1 | 2,4e-03 | 2,4e-03 | 0,22 | 0,6629 |
| Residuales | 4 | 0,04 | 0,01 | | |

Tabla 83. Análisis de la varianza para la variable número de nódulos, transformada logarítmicamente, de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *S. chartreusis* P21.10 (10^5 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 1 | 0,01 | 0,01 | 1,68 | 0,2641 |
| Residuales | 4 | 0,02 | 0,01 | | |

Tabla 84. Análisis de la varianza para la variable número de nódulos, transformada logarítmicamente, de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *B. megaterium* ILBB 592 (10^7 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 1 | 0,04 | 0,04 | 2,70 | 0,1755 |
| Residuales | 4 | 0,06 | 0,01 | | |

Tabla 85. Análisis de la varianza para la variable número de nódulos, transformada logarítmicamente, de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *B. megaterium* ILBB 592 (10^6 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|---------|---------|------|---------|
| Cepa | 1 | 3,0e-03 | 3,0e-03 | 0,47 | 0,5317 |
| Residuales | 4 | 0,03 | 0,01 | | |

Tabla 86. Análisis de la varianza para la variable número de nódulos, transformada logarítmicamente, de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *B. megaterium* ILBB 592 (10^5 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 1 | 0,02 | 0,02 | 1,12 | 0,3499 |
| Residuales | 4 | 0,06 | 0,01 | | |

ENSAYO DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL Y DE ABSORCIÓN DE FÓSFORO

Tabla 87. Análisis de la varianza para la variable peso seco parte aérea de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409 o *chartreusis* P21.10 o *B. megaterium* ILBB 592 o *B. subtilis* DSM 23778 (todas a 10^7 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 4 | 0,83 | 0,21 | 1,74 | 0,156 |
| Dosis | 1 | 0,02 | 0,02 | 0,13 | 0,716 |
| Cepa:Dosis | 4 | 0,13 | 0,03 | 0,27 | 0,896 |
| Residuales | 49 | 5,84 | 0,12 | | |

Tabla 88. Análisis de la varianza para la variable peso seco de nódulos de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409 o *chartreusis* P21.10 o *B. megaterium* ILBB 592 o *B. subtilis* DSM 23778 (todas a 10^7 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|-------|--------|------|---------|
| Cepa | 4 | 9049 | 2262,2 | 2,76 | 0,0381 |
| Dosis | 1 | 670 | 670,4 | 0,82 | 0,3706 |
| Cepa:Dosis | 4 | 1219 | 304,9 | 0,37 | 0,8279 |
| Residuales | 49 | 40226 | 820,9 | | |

Tabla 89. Análisis de la varianza para la variable peso seco de raíz de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409 o *chartreusis* P21.10 o *B. megaterium* ILBB 592 o *B. subtilis* DSM 23778 (todas a 10^7 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|-------|-------|------|---------|
| Cepa | 4 | 0,08 | 0,02 | 1,76 | 0,153 |
| Dosis | 1 | 0,004 | 0,004 | 0,34 | 0,563 |
| Cepa:Dosis | 4 | 0,03 | 0,007 | 0,65 | 0,632 |
| Residuales | 49 | 0,56 | 0,01 | | |

Tabla 90. Análisis de la varianza para la variable número de nódulos, transformada logarítmicamente, de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10^7 ufc.mL⁻¹) y con *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409 o *chartreusis* P21.10 o *B. megaterium* ILBB 592 o *B. subtilis* DSM 23778 (todas a 10^7 ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|----------|--------|------|---------|
| Cepa | 4 | 1705,05 | 426,26 | 1,47 | 0,2266 |
| Dosis | 1 | 55,73 | 55,73 | 0,19 | 0,6633 |
| Cepa:Dosis | 4 | 1083,18 | 270,79 | 0,93 | 0,4532 |
| Residuales | 49 | 14237,20 | 290,56 | | |

Tabla 91. Análisis de la varianza para la variable peso seco parte aérea de plantas de soja inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 cultivadas en fitato de sodio 41,5 nM o KH₂PO₄.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|------|---------|
| Fuente | 1 | 0,43 | 0,43 | 8,47 | 0,0156 |
| Residuales | 10 | 0,51 | 0,05 | | |

Tabla 92. Análisis de la varianza para la variable peso seco parte aérea de plantas de soja inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 cultivadas en fitato de sodio 83 nM o KH₂PO₄.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|------|---------|
| Fuente | 1 | 0,70 | 0,70 | 7,72 | 0,0195 |
| Residuales | 10 | 0,90 | 0,09 | | |

Tabla 93. Análisis de la varianza para la variable peso seco nódulos de plantas de soja inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 cultivadas en fitato de sodio 41,5 nM o KH₂PO₄.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|---------|---------|-------|---------|
| Fuente | 1 | 4708,44 | 4708,44 | 10,96 | 0,0079 |
| Residuales | 10 | 4296,62 | 429,66 | | |

Tabla 94. Análisis de la varianza para la variable peso seco nódulos de plantas de soja inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 cultivadas en fitato de sodio 83 nM o KH₂PO₄.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|---------|---------|------|---------|
| Fuente | 1 | 6993,84 | 6993,84 | 9,85 | 0,0105 |
| Residuales | 10 | 7101,69 | 710,17 | | |

Tabla 95. Análisis de la varianza para la variable peso seco raíz de plantas de soja inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 cultivadas en fitato de sodio 41,5 nM o KH₂PO₄.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|------|------|------|---------|
| Fuente | 1 | 0,06 | 0,06 | 6,74 | 0,0266 |
| Residuales | 10 | 0,08 | 0,01 | | |

Tabla 96. Análisis de la varianza para la variable peso seco raíz de plantas de soja inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 cultivadas en fitato de sodio 83 nM o KH₂PO₄.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|------|------|-------|---------|
| Fuente | 1 | 0,12 | 0,12 | 16,55 | 0,0023 |
| Residuales | 10 | 0,07 | 0,01 | | |

Tabla 97. Análisis de la varianza para la variable número de nódulos, transformada logarítmicamente, de plantas de soja inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 cultivadas en fitato de sodio 41,5 nM o KH₂PO₄.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|------|------|-------|---------|
| Fuente | 1 | 0,18 | 0,18 | 26,16 | 0,0005 |
| Residuales | 10 | 0,07 | 0,01 | | |

Tabla 98. Análisis de la varianza para la variable número de nódulos, transformada logarítmicamente, de plantas de soja inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 cultivadas en fitato de sodio 83 nM o KH₂PO₄.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------|----|------|------|------|---------|
| Fuente | 1 | 0,16 | 0,16 | 7,20 | 0,0229 |
| Residuales | 10 | 0,22 | 0,02 | | |

Tabla 99. Análisis de la varianza para la variable P acumulado de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 (ambas a 10⁷ ufc.mL⁻¹) y con *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* U409 o *chartreusis* P21.10 o *B. megaterium* ILBB 592 o *B. subtilis* DSM 23778 (todas a 10⁷ ufc.mL⁻¹).

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|-------|-------|------|---------|
| Cepa | 4 | 13,57 | 3,39 | 2,61 | 0,0469 |
| Dosis | 1 | 3,30 | 3,30 | 2,54 | 0,1176 |
| Cepa:Dosis | 4 | 14,64 | 3,66 | 2,81 | 0,0353 |
| Residuales | 49 | 63,76 | 1,301 | | |

Tabla 100. Análisis de la varianza para la variable P acumulado de plantas de soja co-inoculadas con *B. elkanii* U1301, U1302 y con *B. megaterium* ILBB 592 cultivadas en fitato de sodio 83 nM comparadas con plantas de soja inoculadas con *B. elkanii* U1301 y U1302 cultivadas en KH_2PO_4 .

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|------------|----|------|------|------|---------|
| Cepa | 1 | 3,28 | 3,28 | 3,44 | 0,0935 |
| Residuales | 10 | 9,53 | 0,95 | | |

FITASAS RIZOBIANAS EN LA SIMBIOSIS SOJA-*Bradyrhizobium elkanii*

- Cultivo hidroaeropónico de soja-*Bradyrhizobium elkanii* U1301 o U1302

Tabla 101. Análisis de la varianza para la variable peso seco parte aérea de los cultivares N5909 y SR532 de soja inoculados con *B. elkanii* U1301 cultivados bajo Psuf y Pdef.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------------|----|-------|-------|-------|---------|
| Condición de P | 1 | 32,01 | 32,01 | 20,57 | 0,00014 |
| Cultivar | 1 | 2,36 | 2,36 | 1,51 | 0,23 |
| Condición de P:Cultivar | 1 | 14,79 | 14,79 | 9,50 | 0,0051 |
| Residuales | 24 | 37,36 | 1,56 | | |

Tabla 102. Análisis de la varianza para la variable peso seco de nódulos de los cultivares N5909 y SR532 de soja inoculados con *B. elkanii* U1301 cultivados bajo Psuf y Pdef.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|-------------------------|----|--------|--------|-------|---------|
| Condición de P | 1 | 178593 | 178593 | 15,05 | 0,00071 |
| Cultivar | 1 | 60904 | 60904 | 5,13 | 0,033 |
| Condición de P:Cultivar | 1 | 111166 | 111166 | 9,37 | 0,0054 |
| Residuales | 24 | 284733 | 11864 | | |

Tabla 103. Análisis de la varianza para la variable peso seco de raíz de los cultivares N5909 y SR532 de soja inoculados con *B. elkanii* U1301 cultivados bajo Psuf y Pdef.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|--------------------------------|----|------|------|------|---------|
| Condición de P | 1 | 1,12 | 1,12 | 5,18 | 0,032 |
| Cultivar | 1 | 0,14 | 0,14 | 0,63 | 0,43 |
| Condición de P:Cultivar | 1 | 1,37 | 1,37 | 6,32 | 0,019 |
| Residuales | 24 | 5,20 | 0,22 | | |

Tabla 104. Análisis de la varianza para la variable número de nódulos, transformada logarítmicamente, de los cultivares N5909 y SR532 de soja inoculados con *B. elkanii* U1301 cultivados bajo Psuf y Pdef.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|--------------------------------|----|------|---------|------|---------|
| Condición de P | 1 | 0,00 | 0,00003 | 0,00 | 0,98 |
| Cultivar | 1 | 0,15 | 0,15 | 2,34 | 0,14 |
| Condición de P:Cultivar | 1 | 0,30 | 0,30 | 4,70 | 0,05 |
| Residuales | 24 | 1,55 | 0,064 | | |

Tabla 105. Análisis de la varianza para la variable P acumulado de los cultivares N5909 y SR532 de soja inoculados con *B. elkanii* U1301 cultivados bajo Psuf y Pdef.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|--------------------------------|----|---------|----------|-------|---------|
| Condición de P | 1 | 0,0021 | 0,00021 | 27,79 | 0,0008 |
| Cultivar | 1 | 0,00019 | 0,00019 | 2,45 | 0,16 |
| Condición de P:Cultivar | 1 | 0,00059 | 0,00059 | 7,81 | 0,023 |
| Residuales | 8 | 0,00061 | 0,000076 | | |

- **RT-PCR *in situ* de transcritos HAP rizobianos en nódulos de soja**

Tabla 106. Análisis de la varianza para la variable intensidad de la señal fluorescente emitida por los transcritos HAP rizobianos en sección nodulares de cultivares de soja N5909 y SR532 inoculados con *B. elkanii* U1301 en condiciones de Psuf y Pdef.

| | gl | SC | CM | F | p-valor |
|--------------------------------|-----|----------|----------|-------|----------|
| Condición de P | 1 | 2,91e+18 | 2,91e+18 | 56,96 | 9,32e-13 |
| Cultivar | 1 | 8,6e+17 | 8,6e+17 | 16,87 | 5,50e-05 |
| Condición de P:Cultivar | 1 | 8,55e+17 | 8,55e+17 | 16,75 | 5,82e-05 |
| Residuales | 239 | 1,22e+19 | 5,10e+16 | | |

ANEXO V-RT y NRT-PCR *in situ* de transcritos HAP rizobianos en nódulos de soja

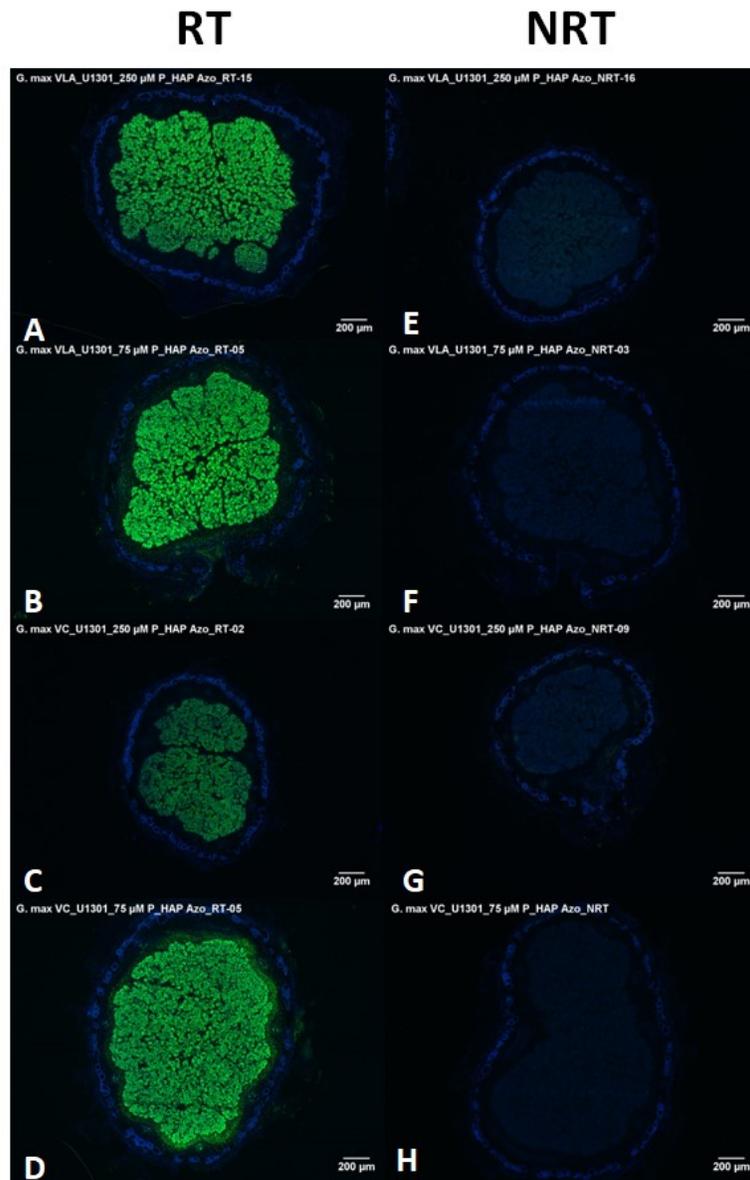


Figura 24. Localización *in situ* de transcritos HAP rizobianos (señal verde) en secciones nodulares de soja N5909 y SR532 inoculados con *B. elkanii* U1301 en condiciones de Psuf (250 $\mu\text{mol P.planta}^{-1}$) y Pdef (75 $\mu\text{mol P.planta}^{-1}$) (RT-izquierda), con sus respectivos controles negativos, es decir sin adición de transcriptasa reversa a la *mix* de reacción utilizada en la RT (NRT-derecha), **A y E**, N5909 bajo Psuf; **B y F**, N5909 bajo Pdef; **C y G**, SR532 bajo Psuf; **D y H**, SR532 bajo Pdef. Tiempo de exposición: DAPI: 350 ms, ELF: 500 ms. Aumento: 5X.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Abd-Alla, M. (1994) Use of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae* phosphatases. **Biology and Fertility of Soils**, 18, p. 216-218.

Abreo, E.; Valle, D.; Mujica, V. & Altier, N. (En imprenta) Pathogenicity and virulence factors of *Lysinibacillus xylanilyticus* and *Bacillus* spp. Towards *Argyrotaenia spheropa* larvae (Lepidoptera). **Journal of Applied Entomology**.

Ahemad, M. & Khan, M. S. (2010) Phosphate-solubilizing and plant-growth-promoting *Pseudomonas aeruginosa* PS1 improves green gram performance in quizalafop-p-ethyl and clodinafop amended soil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 58, p. 361-372.

Alexander, M. (1977) **Introduction to soil microbiology**. Estados Unidos, Wiley.

Alikhani, H. A.; Saleh-Rastin, N. & Antoun, H. (2006) Phosphate solubilization of rhizobia native to Iranian soils. **Plant and Soil**, 287, p. 35-41.

Altier, N.; Beyhaut, E. & Pérez, C. (2013) Root nodule and rhizosphere bacteria for forage legume growth promotion and disease management. En: Maheshwari, D. K., ed.; Saraf, M., ed. & Aeron, A., ed. **Bacteria in Agrobiolgy: Crop Productivity**. Alemania, Springer-Verlag, p. 167-183.

Angle, J. S.; McGrath, S. P. & Chaney, R. L. (1991) New culture medium containing ionic concentrations of nutrients similar to concentrations found in the soil solution. **Applied and Environmental Microbiology**, 57 (12), p. 3674-3676.

Araújo, A. P.; Plassard, C. & Drevon, J. J. (2008) Phosphatase and phytase activities in nodules of common bean genotypes at different levels of phosphorus supply. **Plant and Soil**, 312, p. 129-138.

Azziz, G. (2010) **Bacterias solubilizadoras de fosfato: abundancia y diversidad en suelos del Uruguay bajo siembra directa**. Tesis de Maestría, Universidad de la República.

Azziz, G.; Bajsa, N.; Haghjou, T.; Taulé, C.; Valverde, A.; Igual, J. M. & Arias, A. (2012) Abundance, diversity and prospecting of culturable phosphate solubilizing bacteria on soils

under crop-pasture rotations in a no-tillage regime in Uruguay. **Applied Soil Ecology**, 61, p. 320-326.

Banik, S. & Dey, B. K. (1982) Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate solubilizing bacteria. **Plant and Soil**, 69, p. 353–364.

Barber, S. A. (1995) **Soil nutrient bioavailability : a mechanistic approach**. Estados Unidos, John Wiley & Sons.

Bargaz, A.; Ghoulam, C.; Amenc, L.; Lazali, M.; Faghire, M.; Abadie, J. & Drevon, J. J. (2012) A phosphoenol pyruvate phosphatase transcript is induced in the root nodule cortex of *Phaseolus vulgaris* under conditions of phosphorus deficiency. **Journal of Experimental Botany**, 63 (13), p. 4723-4730.

Bashan, Y.; Kamnev, A. A. & de-Bashan, L. E. (2013) Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. **Biology and Fertility of Soils**, 49, p. 465-479.

Belinque, H.; Pucheu, N.; Kerber, N. & Rubio, G. (2015) Utilization of organic phosphorus sources by oilseed rape, sunflower, and soybean. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, 178, p. 339–344.

Beringer, J. E. (1974) R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, 84 (1), p. 188-198.

Bertramson, B. R. (1942) Phosphorus analysis of plant material. **Plant Physiology**, 17, p. 447–454.

Beyhaut, E. ; DeHaan, L. R. ; Byun, J. L. ; Sheaffer, C. C. & Graham, P. H. (2006) Response to inoculation in Illinois bundleflower. **Canadian Journal of Plant Science**, 86 (4), p. 919-926.

Bordoli, J. M.; Barbazán, M. M. & Rocha, L. (2013) **Relevamiento nutricional del cultivo de soja en Uruguay** [Internet], Publicaciones, International Plant Nutrition Institute (IPNI). Disponible desde: [http://www.ipni.net/publication/ia-lacs.nsf/0/1DD0051049AA068A85257BE100528EF8/\\$FILE/8.pdf](http://www.ipni.net/publication/ia-lacs.nsf/0/1DD0051049AA068A85257BE100528EF8/$FILE/8.pdf) [Acceso 19 de Febrero de 2018].

Brown, L. K.; George, T. S.; Barrett, G. E.; Hubbard, S. F. & White, P. J. (2013) Interactions between root hair length and arbuscular mycorrhizal colonisation in phosphorus deficient barley (*Hordeum vulgare*). **Plant and Soil**, 372, p. 195-205.

Bucher, M. (2007) Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. **New Phytologist Journal**, 173 (1), p. 11-26.

Chauhan, B. S.; Stewart, J. W. B. & Paul, E. A. (1981) Effect of labile inorganic phosphate status and organic carbon additions on the microbial uptake of phosphorus in soils. **Canadian Journal of Soil Science**, 61, p. 375-385.

Chen, Z.; Ma, S. & Liu, L. (2008) Studies on phosphorus solubilizing activity of a strain of phosphobacteria isolated from chestnut type soil in China. **Bioresource Technology**, 99, p. 6702-6707.

Conde, D. (2009) Biología, floraciones y distribución de las cianobacterias. En: Bonilla, S., ed. **Cianobacterias Planctónicas del Uruguay**. Uruguay, Programa Hidrológico Internacional de la Unesco, p. 12-16.

Cordell, D.; Drangert, J. O. & White, S. (2010) The story of phosphorus: Global food security and food for thought. **Global Environmental Change**, 19, p. 292–305.

Del Pino, A. & Hernández, J. (2002) Ciclaje de fósforo por animales bajo pastoreo en campo natural y mejoramientos con leguminosas sobre suelos de basalto. **Agrociencia**, 6, p. 47-52.

Fox, S. L.; O'Hara, G. W. & Bräu, L. (2011) Enhanced nodulation and symbiotic effectiveness of *Medicago truncatula* when co-inoculated with *Pseudomonas fluorescens* WSM3457 and *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *medicae* WSM419. **Plant and Soil**, 348, p. 245-255.

Goldstein, A. H.; Rogers, R. D. & Mead, G. (1993) Mining by microbe. **Nature Biotechnology**, 11, p. 1250-1254.

Gyaneshwar, P.; Naresh Kumar, G.; Parekh, L. J. & Poole, P. S. (2002) Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, 245, p. 83-93.

Hariprasad, P. & Niranjana, S. R. (2009) Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. **Plant and Soil**, 316, p. 13–24.

Harmsen, J. (2007) Measuring bioavailability: From a scientific approach to standard methods. **Journal of Environmental Quality**, 36, p. 1420-1428.

Hernández, J. (1997) Óxidos de hierro en los suelos: sus propiedades y su caracterización con énfasis en los estudios de retención de fósforo. **Agrociencia**, 1, p. 1-14.

Hernández, J. & Meurer, E. (1998) Adsorção de fósforo e sua relação com formas de ferro em solos do Uruguai. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 22, p. 223-230.

Hernández, J.; Otegui, O. & Zamalvide, J. P. (1995) Formas y contenidos de fósforo en algunos suelos del Uruguay. **Boletín de Investigaciones, Facultad de Agronomía, Universidad de la República**, 43, p. 32.

Hernández, J. & Zamalvide, J. P. (1998) Procesos de retención de fósforo por los suelos evaluados a través de parámetros de suelo y planta. **Agrociencia**, 2, p. 48-63.

Hill, J. E.; Kysela, D. & Elimelech, M. (2007) Isolation and assessment of phytate-hydrolysing bacteria from the DelMarVa Peninsula. **Environmental Microbiology**, 9 (12), p. 3100-3107.

Hinsinger, P.; Brauman, A.; Devau, N.; Gérard, F.; Jourdan, C.; Laclau, J. P.; Le Cadre, E.; Jaillard, B. & Plassard, C. (2011) Acquisition of phosphorus and other poorly mobile nutrients by roots. Where do plant nutrition models fail? **Plant and Soil**, 348, p. 29-61.

Hinsinger, P.; Herrmann, L.; Lesueur, D.; Robin, A.; Trap, J.; Waithaisong, K. & Plassard, C. (2015) Impact of roots, microorganisms and microfauna on the fate of soil phosphorus in the rhizosphere. En: Plaxton, W. C., ed. & Lambers, H., ed. **Phosphorus metabolism in plants**. Estados Unidos, John Wiley & Sons, Ltd., p. 377-408.

Hinsinger, P.; Plassard, C.; Tang, C. X. & Jaillard, B. (2003) Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. **Plant and Soil**, 249, p. 43-59.

Holtan, H.; Kamp-Nielsen, L. & Stuanes, A. (1988) Phosphorus in soil, water and sediment: an overview. **Hydrobiologia**, 170, p. 19-34.

- Hui, L.; Xiao-Qin, W.; Jia-Hong, R. & Jian-Ren, Y. (2011) Isolation and identification of phosphobacteria in poplar rhizosphere from different regions of China. **Pedosphere**, 21, p. 90-97.
- Idriss, E. E.; Makarewicz, O.; Farouk, A.; Rosner, K.; Greiner, R.; Bochow, H.; Richter, T. & Borriss, R. (2002) Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. **Microbiology**, 148, p. 2097-2109.
- Jakobsen, I.; Abbott, L. K. & Robson, A. D. (1992) External hyphae of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. 1. 2. Hyphal transport of P³² over defined distances. **New Phytologist**, 120, p. 509-516.
- Jones, D. L. & Oburger, E. (2011) Solubilization of phosphorus by soil microorganisms. En: Bünemann, E. K., ed.; Oberson, A., ed. & Frossard, E., ed. **Phosphorus in Action. Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling**. Alemania, Springer-Verlag, p. 169–198.
- Jorquera, M.; Hernández, M.; Rengel, Z.; Marschner, P. & Mora, M. de la L. (2008a) Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. **Biology and Fertility of Soils**, 44, p. 1025-1034.
- Jorquera, M.; Martínez, O.; Maruyama, F.; Marschner, P. & Mora, M. de la L. (2008b) Current and future biotechnological applications of bacterial phytases and phytase-producing bacteria. **Microbes and Environments**, 23 (3), p. 182-191.
- Kalia, V. C. & Drevon, J. J. (1985) Variation de l'activite nitrogenase (reduction de l'acetylene) pendant l'incubation *in situ* des nodosites de *Glycine max* (L.) Merr. **Comptes Rendus de l'Academie des Sciences**, 301 (3), p. 591-596.
- Karpagam, T. & Nagalakshmi, P. K. (2014) Isolation and characterization of Phosphate Solubilizing Microbes from Agricultural soil. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 3 (3), p. 601-614.
- Khan, M. S.; Ahmad, E.; Zaidi, A. & Oves, M. (2013) Functional aspect of phosphate-solubilizing bacteria: importance in crop production. En: Maheshwari, D. K., ed. **Bacteria in agrobiolgy: crop productivity**. Alemania, Springer-Verlag, p. 237-263.

Khan, M. S.; Zaidi, A. & Wani, P. A. (2007) Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture-a review. **Agronomy for Sustainable Development**, 27, p. 29-43.

Khan, M. S.; Zaidi, A.; Wani, P. A.; Ahemad, M. & Oves, M. (2009) Functional diversity among plant growth-promoting rhizobacteria. En: Khan, M. S., ed.; Zaidi, A., ed. & Musarrat, J., ed. **Microbial strategies for crop improvement**. Alemania, Springer, p. 105-132.

Kloepper, J. W. & Schroth, M. N. (1978) Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. En: Station de Pathologie Végétale et de Phytobactériologie, INRA. **4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Angers, France**. France, INRA, p. 879–882.

Koo, K. & Jaykus, L. A. (2000) Selective amplification of bacterial RNA: use of a DNA primer containing mismatched bases near its 30 terminus to reduce false-positive signals. **Letters in Applied Microbiology**, 31, p. 187-192.

Kucey, R. M. N.; Jenzen, H. H. & Leggett, M. E. (1989) Microbially mediated increases in plant available phosphorus. **Advances in Agronomy**, 42, p. 199–228.

Kumar, P.; Dubey, R. C. & Maheshwari, D. K. (2012) Bacillus strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. **Microbiological Research**, 167, p. 493-499.

Lal, S. & Tabacchioni, S. (2009) Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview. **Indian Journal of Microbiology**, 49 (1), p. 2-10.

Lambers, H.; Clements, J. C. & Nelson, M. N. (2013) How a phosphorus-acquisition strategy based on carboxylate exudation powers the success and agronomic potential of lupines (*Lupinus, Fabaceae*). **American Journal of Botany**, 100, p. 263-288.

Lazali, M.; Brahimi, S.; Merabet, C.; Latati, M.; Benadis, C.; Maougal, R. T. ; Blavet, D.; Drevon, J. J. & Ounane, S. M. (2016) Nodular diagnosis of contrasting recombinant inbred lines of *Phaseolus vulgaris* in multi-local field tests under Mediterranean climate. **European Journal of Soil Biology**, 79, p. 100-107.

Lazali, M.; Zaman-Allah, M.; Amenc, L.; Ounane, G.; Abadie, J. & Drevon, J. J. (2013) A phytase gene is overexpressed in root nodules cortex of *Phaseolus vulgaris*–rhizobia symbiosis under phosphorus deficiency. **Planta**, 238, p. 317-324.

Lindström, K.; Murwira, M.; Willems, A. & Altier, N. (2010) The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. **Research in Microbiology**, 161, p. 453-463.

Mandri, B.; Drevon, J. J.; Bargaz, A.; Oufdou, K.; Faghire, M.; Plassard, C.; Payre, H. & Ghoulam, C. (2012) Interactions between common bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes and rhizobia strains isolated from Moroccan soils for growth, phosphatase and phytase activities under phosphorus deficiency conditions. **Journal of Plant Nutrition**, 35, p. 1477-1490.

Maougal, R. T.; Bargaz, A.; Sahel, C.; Amenc, L.; Djekoun, A.; Plassard, C. & Drevon, J. J. (2014a) Localization of the *Bacillus subtilis* beta-propeller phytase transcripts in nodulated roots of *Phaseolus vulgaris* supplied with phytate. **Planta**, 239, p. 901-908.

Maougal, R. T.; Brauman, A.; Plassard, C.; Abadie, J.; Djekoun, A. & Drevon, J. J. (2014b) Bacterial capacities to mineralize phytate increase in the rhizosphere of nodulated common bean (*Phaseolus vulgaris*) under P deficiency. **European Journal of Soil Biology**, 62, p. 8-14.

Mareque, C.; Taulé, C.; Beracochea, M. & Battistoni, F. (2015) Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). **Annals of microbiology**, 65, p. 1057-1067.

McSpadden Gardener, B. B. (2004) Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. **Phytopathology**, 94 (11), p. 1252-1258.

Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) (2017a) **Encuesta Agrícola “Primavera 2016”** [Internet], Uruguay, Oficina de Estadísticas Agropecuarias (DIEA), MGAP. Disponible desde: < <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/estadisticas/produccion-vegetal/agricultura-de-secano/agricola-primavera-2016>> [Acceso 19 de Febrero de 2018].

Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) (2017b) **Resultados del Monitoreo de Producción de Soja 2017** [Internet], Uruguay, DIEA, MGAP. Disponible desde: <<http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/diea-presenta-los-resultados-del-monitoreo-de-produccion-de-soja-2017>> [Acceso 19 de Febrero de 2018].

Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) (2016) **Datos estadísticos de importaciones de Fertilizantes** [Internet], Uruguay, Dirección General de Servicios Agrícolas

(DGSA), MGAP. Disponible desde: <<http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/direccion-general-de-servicios-agricolas/tramites-y-servicios/servicios/datos-fertilizantes>> [Acceso 19 de Febrero de 2018].

Montañez, A.; Rodríguez Blanco, A.; Barlocco, C.; Beracochea, M. & Sicardi, M. (2012) Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects *in vitro*. **Applied Soil Ecology**, 58, p. 21-28.

Morón, A. (1996) El fósforo en los sistemas productivos: dinámica y disponibilidad en el suelo. En: Morón, A., ed.; Martino, D., ed. & Sawchik, J., ed. **Manejo y Fertilidad de Suelos**. Uruguay, INIA- Serie Técnica, 76, p. 37-44.

Mullaney, E. J. & Ullah, A. H. (2007) Phytases: attributes, catalytic mechanisms, and applications. En: Turner, L., ed.; Richardson, A. E., ed. & Mullaney, E. J., ed. **Inositol Phosphates: Linking Agriculture and the Environment**. Reino Unido, CAB International, p. 97–110.

Mullaney, E. J. & Ullah, A. H. J. (2003) The term phytase comprises several different classes of enzymes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 312, p. 179–184.

Nannipieri, P.; Giagnoni, L.; Landi, L. & Renella, G. (2011) Role of phosphatase enzymes in soil. En: Bünemann, E. K., ed.; Oberson, A., ed. & Frossard, E., ed. **Phosphorus in Action: Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling**. Alemania, Springer-Verlag, p. 215–244.

Nuñez, L. (2017) **Evaluación y desarrollo de herramientas que contribuyen al diseño de un índice de salud del suelo para la siembra de soja (*Glycine max* L. Merr)**. Tesis de Maestría, Universidad de la República.

Ohno, T. & Zibilske, L. M. (1991) Determination of low concentrations of phosphorus in soil extracts using malachite green. **Soil Science Society of America Journal**, 55, p. 892-895.

Paragas, V. B.; Zhang, Y. Z.; Haugland, R. P. & Singer, V.L. (1997) The ELF-97 alkaline phosphatase substrate provides a bright, photostable, fluorescent signal amplification method for FISH. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 40, p. 1299–1308.

Park, K. H.; Lee, O. M.; Jung, H. I.; Jeong, J. H.; Jeon, Y. D.; Hwang, D. Y.; Lee, C. Y. & Son, H. J. (2010) Rapid solubilization of insoluble phosphate by a novel environmental stress-tolerant *Burkholderia vietnamiensis* M6 isolated from ginseng rhizospheric soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 86, p. 947–955.

Patel, K. J.; Singh, A. K.; Nareshkumar, G. & Archana, G. (2010) Organic-acidproducing, phytate-mineralizing rhizobacteria and their effect on growth of pigeon pea (*Cajanus cajan*). **Applied Soil Ecology**, 44 (3), p. 252–261.

Pérez, C.; Dill-Macky, R. & Kinkel, L. L. (2007) Management of soil microbial communities to enhance populations of *Fusarium graminearum*-antagonists in soil. **Plant and Soil**, 302, p. 53-69.

Pérez, E.; Sulbarán, M.; Ball, M. M. & Yarzabal, L. A. (2007) Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. **Soil Biology and Biochemistry**, 3, p. 2905-2914.

Perveen, S.; Khan, M. S. & Zaidi, A. (2002) Effect of rhizospheric microorganisms on growth and yield of green gram (*Phaseolus radiates* L.). **Indian Journal of Agricultural Science**, 72, p. 421-423.

Plante, A. F. (2007). Soil biogeochemical cycling of inorganic nutrients and metals. En: Paul, E. A., ed. **Soil microbiology and biochemistry**. Estados Unidos, Elsevier Academic Press, p. 391–398.

Oh, B. C.; Choi, W. C.; Park, S.; Kim, Y. O. & Oh, T. K. (2004) Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 63, P. 362–372.

Oliveira, C. A.; Alves, V. M. C.; Marriel, I. E.; Gomes, E. A.; Scotti, M. R.; Carneiro, N. P.; Guimarães, C. T.; Schaffert, R. E. & Sà, N.M.H. (2009) Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, 4, p. 1782–1787.

Quiquampoix, H. & Mousain, D. (2005) Enzymatic hydrolysis of organic-phosphorus. En: Turner, B. L., ed.; Frossard, E., ed. & Baldwin, D. S., ed. **Organic-phosphorus in the environment**. Reino Unido, CAB International, p. 89-112.

R core team (2018) **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.

Rahi, P.; Vyas, P.; Sharma, S.; Gulati, A. & Gulati, A. (2009) Plant growth promoting potential of the fungus *Discosia* sp. FIHB 571 from tea rhizosphere tested on chickpea, maize and pea. **Indian Journal of Microbiology**, 49 (2), p. 128–133.

Ramesh, A.; Sharma, S. K. & Yadav, N. (2014) Phosphorus mobilization from native soil P-pool upon inoculation with phytate-mineralizing and phosphate-solubilizing *Bacillus aryabhatai* isolates for improved P-acquisition and growth of soybean and wheat crops in microcosm conditions. **Agricultural Research**, 3 (2), p. 118-127.

Ramírez, C. A. & Kloepper, J. W. (2010) Plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 depends on inoculum rate and P-related soil properties. **Biology and Fertility of Soils**, 46, p. 835-844.

Richardson, A. E. (2001) Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, 28, p. 897-906.

Richardson, A. E.; George, T. S.; Hens, M. & Simpson, R. J. (2005) Utilization of soil organic phosphorus by higher plants. En: Turner, B. L., ed.; Frossard, E., ed. & Baldwin, D. S., ed. **Organic Phosphorus in the Environment**. Reino Unido, CABI, p. 165–184.

Richardson, A. E. & Hadobas, P. A. (1997) Soil isolates of *Pseudomonas* spp. that utilize inositol phosphates. **Canadian Journal of Microbiology**, 43, p. 509–516.

Richardson, A. E.; Hadobas, P. A.; Hayes, J. E.; Hara, C. P. & Simpson, R. J. (2001) Utilization of phosphorus by pasture plants supplied with myo-inositol hexaphosphate is enhanced by the presence of soil micro-organisms. **Plant and Soil**, 229, p. 47–56.

Richardson, A. E. & Simpson, R. J. (2011) Soil microorganisms mediating phosphorus availability. **Plant Physiology**, 156, p. 989-996.

- Rivas, R.; Velázquez, E.; Valverde, A.; Mateos, P.F. & Martínez-Molina, E. (2001) A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. **Electrophoresis**, 22, p. 1086-1089.
- Rosas, S. B.; Andrés, J. A.; Rovera, M. & Correa, N. S. (2006) Phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* can influence the rhizobia-legume symbiosis. **Soil Biology and Biochemistry**, 38, p. 3502-3505.
- Ryu, C. M.; Hu, C. H.; Locy, R. D. & Kloepper, J. W. (2005) Study of mechanisms for plant growth promotion elicited by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Soil**, 268, p. 285–292.
- Sharma, S. K.; Johri, B. N.; Ramesh, A.; Joshi, O. P. & Sai Prasad, S. V. (2011) Selection of plant growth-promoting *Pseudomonas* spp. that enhanced productivity of soybean-wheat cropping system in central India. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 21, p. 1127-1142.
- Sharma, S. B.; Sayyed, R.; Trivedi, M. H. & Gobi, T. A. (2013) Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **Springer Plus**, 2, p. 587-601.
- Schenk, G.; Mitic, N.; Hanson, G. R. & Comba, P. (2013) Purple acid phosphatase: A journey into the function and mechanism of a colorful enzyme. **Coordination Chemistry Reviews**, 257, p. 473–482.
- Schneider, C. A.; Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature methods**, 9 (7), p. 671-675.
- Shirling, E. B. & Gottlieb, D. (1966) Methods for characterization of *Streptomyces species*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 16, p. 313-340.
- Singh, P.; Kumar, V. & Agrawal, S. (2014) Evaluation of phytase producing bacteria for their plant growth promoting activities. **International Journal of Microbiology**, 2014, p. 1-7.
- Singh, B. & Satyanarayana, T. (2011) Microbial phytase in phosphorus acquisition and plant growth promotion. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, 17 (2), p. 93-103.

- Singh, B. & Satyanarayana, T. (2010) Plant growth promotion by an extracellular HAP-phytase of a thermophilic mold *Sporotrichum thermophile*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 160 (5), p. 1267–1276.
- Skrary, F. A. & Cameron, D. C. (1998) Purification and characterization of a *Bacillus licheniformis* phosphatase specific for D-alpha-glycerophosphate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 349, p. 27–35.
- Somasegaran, P. & Hoben, H. J. (1994) **Handbook for rhizobia: Methods in legume-Rhizobium technology**. Estados Unidos, Springer Verlag.
- Somasegaran, P. & Hoben, H. J. (1985) Methods in Legume-Rhizobium Technology. **NifTAL Project and MIRCEN**. Department of Agronomy, 2nd Soil Science Hawaii Institute Tropical Agriculture Human Research, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, p. 1-52.
- Spohn, M.; Ermak, A. & Kuzyakov, Y. (2013) Microbial gross organic-Phosphorus mineralization can be stimulated by root exudates a ^{33}P isotopic dilution study. **Soil Biology and Biochemistry**, 65, p. 254–263.
- Tadano, T.; Ozawa, K.; Sakai, H.; Osaki, H. & Matsui, H. (1993) Secretion of acid-phosphatase by the roots of crop plant under phosphorus-deficient conditions and some properties of the enzyme secreted by lupin roots. **Plant and Soil**, 155, p. 95-98.
- Tajini, F.; Suriyakup, P.; Vailhe, H.; Jansa, J. & Drevon, J. J. (2009) Assess suitability of hydroaerobic culture to establish tripartite symbiosis between different AMF species, beans, and rhizobia. **BMC Plant Biology**, 9, p. 73–81.
- Tarafdar, J. C.; Yadav, R. S. & Meena, S. C. (2001) Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, 164, p. 279–282.
- Taulé, C.; Mareque, C.; Barlocco, C.; Hackembruch, F.; Reis, V. M.; Sicardi, M. & Battistoni, F. (2012) The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant and Soil**, 356, p. 35-49.

Thaller, M. C.; Berlutti, F.; Schippa, S; Lori, P.; Passariello, C. & Rossolini, G. M. (1995) Heterogeneous patterns of acid phosphatases containing low-molecular-mass Polypeptides in members of the family *Enterobacteriaceae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 4, p. 255–261.

Tlustý, B.; van Berkum, P. & Graham, P. H. (2005) Characteristics of the rhizobia associated with *Dalea* spp. in the Ordway, Kellogg-Weaver Dunes, and Hayden prairies. **Canadian Journal of Microbiology**, 51, p. 15-23.

Tsai, S.M. & Rosseto, R. (1992) Transformações microbianas do fósforo. En: Cardoso, E.J.B.N., ed. **Microbiologia do Solo**. Brasil, Sociedade Brasileira Ciencia do Solo.

Unno, Y.; Okubo, K.; Wasaki, J.; Shinano, T. & Osaki, M. (2005) Plant growth promotion abilities and microscale bacterial dynamics in the rhizosphere of Lupin analysed by phytate utilization ability. **Environmental Microbiology**, 7 (3), p. 396–404.

Uruguay XXI (2017) Informe Anual de Comercio Exterior [Internet], Uruguay, Uruguay XXI. Disponible desde: <<http://www.uruguayxxi.gub.uy/informacion/wp-content/uploads/sites/9/2018/01/Informe-Anual-de-Comercio-Exterior-2017.pdf>> [Acceso 19 de Febrero de 2018].

Vadez, V. & Drevon, J. J. (2001) Genotypic variability in phosphorus use efficiency for symbiotic N₂ fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Agronomie, EDP Sciences**, 21 (67), p.691-699.

Vance, C. (2001) Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. **Plant Physiology**, 127, p. 390-397.

Vance, C. P.; Uhde-Stone, C. & Allan, D. L. (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, 157, p. 423–447.

Vaz, P.; Altier, N.; Pérez, C. A. & Kinkel, L. (2018) Cropping history effects on pathogen suppressive and signaling dynamics in *Streptomyces* communities. **Phytobiomes**, 2 (1), p. 14-23.

Versalovic, J.; de Bruijn, F. J. & Lupski, J. R. (1998) Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) DNA fingerprinting of bacterial genomes. En: Bruijn, F. J.; Lupski, J. R. & Weinstock, G. eds. **Bacterial genomes: physical structures and analysis**. Estados Unidos, Chapman and Hall, p. 437-454.

Wyss, M.; Brugger, R.; Kronenberger, A.; Rémy, R.; Fimbel, R.; Oesterhelt, G.; Lehmann, M. & van Loon, A. P. G. M. (1999) Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. **Applied and Environmental Microbiology**, 65, p. 367–373.

Xiang, W. L.; Liang, H. Z.; Liu, S.; Luo, F.; Tang, J.; Li, M. Y. & Che, Z. M. (2011) Isolation and performance evaluation of halotolerant phosphate solubilizing bacteria from the rhizospheric soils of historic Dagong Brine Well in China. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 27, p. 629-2637.

Xianzhen, Li. (1997) *Streptomyces cellulolyticus* sp. nov., a new cellulolytic member of the genus *Streptomyces*. **Internation Journal of Systematic Bacteriology**, 47 (2), p. 443-445.

Yadav, B. K. & Tarafdar, J. C. (2007) Ability of *Emericella rugulosa* to mobilize unavailable P compounds during Pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] crop under arid condition. **Indian Journal of Microbiology**, 47, p. 57–63.

Yadav, R.S. & Tarafdar, J. C. (2003) Phytase and phosphatase producing fungi in arid and semi-arid soils and their efficiency in hydrolyzing different organic P compounds. **Soil Biology and Biochemistry**, 35 (6), p. 745–751.

Yao, M. Z.; Zhang, Y. H.; Lu, W. L. ; Hu, M. Q. ; Wang, W. & Liang, A. H. (2011) Phytases : crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications. **Journal of Applied Microbiology**, 112 (1), p. 1-14.

Yi, Y. M.; Huang, W. Y. & Ge, Y. Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24, p. 1059-1065.

Yoon, S. J.; Choi, Y. J.; Min, H. K.; Cho, K. K.; Kim, J. W.; Lee, S. C. & Jung, Y. H. (1996) Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, 18, p. 449–454.

Yu, X.; Liu, X.; Zhu, T.-H.; Liu, G.-H. & Mao, C. (2012) Co-inoculation with phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their effect on growth promotion and nutrient uptake by walnut. **European Journal of Soil Biology**, 50, p. 112-117.

Zhang, S.; Liao, S.; Yu, X. ; Lu, H. ; Xian, J. ; Guo, H.; Wang, A. & Xie, J. (2015) Microbial diversity of mangrove sediment in Shenzhen Bay and gene cloning, characterization of an isolated phytase-producing strain of SPC09 *B. cereus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 99, p. 5339-5350.